

# **EXHIBIT 5**

# USAMI INTERNATIONAL PATENT OFFICE

NO.102 32-TSUKIMIGAOKA, YATOMI-CHO,  
MIZUHO-KU, (POST NO.467) NAGOYA, JAPAN.

TELEPHONE. 81 52 831 0901  
CABLE ADDRESS. USAMIPAT NAGOYA  
FACSIMILE 81 52 834 2330

November 22, 1996

ENZO BIOCHEM INC.  
527 Madison Avenue (9th Floor)  
New York, N.Y. 10022  
U.S.A.

BY AIRMAIL

Re: Japanese Application No.90041/84  
Your Ref.: ENZ-11(Japan)  
Our Ref.: P-59-40

RECEIVED  
DEC 7 - 1996  
RONALD C. FEDUS

Dear Mr. Fedus

We have pleasure in enclosing herewith Letters Patent issued on the above identified application, together with the Official Receipt for 1st to 3rd annuities.


Particulars are as follows:

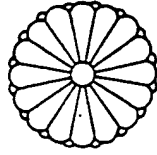
Japanese Patent No.:	2577881
Application No.:	59-090041
Title:	Assay Method Utilizing Polynucleotide Sequences
Patentee(s)	Enzo Biochem, Inc.
Inventor(s)	Robert G. Pergolizzi, Jannis G. Stavrianopoulos, Erazar Rabbani, Dean L. Engelhardt, and Stan Kline
Date of Grant	November 7, 1996
Duration:	20 Years since the filing date (till May 4, 2004)
Annuities Due:	November 7, 1999

Publication of this patent will be issued soon. Opposition may be lodged within six months from publication.

Please let us know receipt of this document by return fascimile.

Very truly yours,

  
Tadao Usami  
TU/ys  
Enc.



特 許 証

昭和59年 特 許 願第090041号

特 許 第 2 5 7 7 8 8 1 号

発 明 の 名 称

ポリスクレオチド連鎖を利用する検定方法

特許権者

アメリカ合衆国 10022 ニューヨーク, ニューヨーク マディソン アヴェニュー

527

国 籍    アメリカ合衆国

エソゾー バイオケム, インコーポレイティド

発 明 者

ロバート ジー。ベルゴリッチ

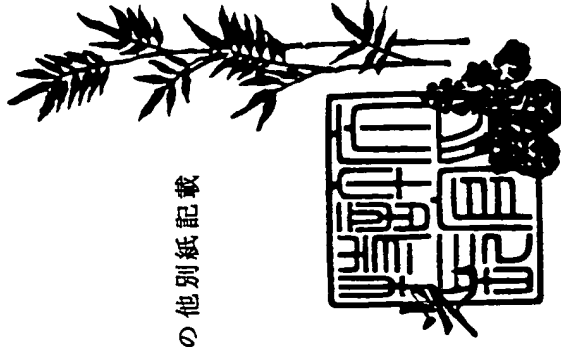
この発明は、特許するものと確定し、特許原簿に登録されたことを証する。

平成 8年11月 7日

特 許 庁 長 官

荒 井 寿

その他別紙記載



USAMI INTERNATIONAL PATENT OFFICE  
No.102 32 Tsukimigaoka, Yatomi-cho,  
Mizuho-ku, Nagoya 467 JAPAN  
Tel. 81 52 831 0901  
Fax 81 52 834 2330

Mr. Ronald C. Fedus  
ENZO BIOCHEM, INC.  
527 Madidon Avenue  
New York, NY 10022  
U.S.A

February 14, 1997

VIA FACSIMILE  
& AIRMAIL

Re: Japanese Patent No. 2557781  
Japanese Patent Application No. 90041/84  
Your Ref.: Enz-11 (Japan)  
Our Ref.: P-59-40

---

Dear Mr. Fedus:

Today we have received Publication issued February 5, 1997 enclosed herewith.

An Opposition against a patent may be filed within six months from the Publication, by August 5, 1997 in this case.

Please refer to your facsimile letter of February 5, 1997 concerning your interest to pursue commercial activities in Japan with respect to this patent.

It is fully secured under Japanese Patent Law that Enzo Biochem, Inc. is the sole assignee (as sole applicant) of this patent and the sole owner of the right in this patent at present status. Accordingly, no more legal document or action is required.

Further, you are at liberty to pursue commercial activities as the sole patentee in Japan without further documents, even if during the opposition period.

If you have further question, please get in touch with us.

Very truly yours,



Tadao Usami  
TU/ys  
Enc.

p. 57-40

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2577881号

(45) 発行日 平成 9 年 (1997) 2 月 5 日

(24) 登録日 平成 8 年 (1996) 11 月 7 日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	
C 0 1 N 33/50			C 0 1 N 33/50	Z
33/58			33/58	Z

発明の数 3 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願昭59-90041	(73) 特許権者	999999999 エンゾー バイオケム、インコーポレイ ティド アメリカ合衆国 10017 ニューヨーク、 ニューヨーク、フィフス アヴェニュー 575
(22) 出願日	昭和59年(1984) 5 月 4 日	(72) 発明者	ロバート ジー、ベルゴリッチ アメリカ合衆国 07646 ニュージャー ジー、ニューミルフォード、ニューブリ ッジロード 375
(65) 公開番号	特開昭59-220647	(74) 代理人	弁理士 宇佐見 忠男
(43) 公開日	昭和59年(1984)12月12日		
(31) 優先権主張番号	4 9 1 9 2 9		
(32) 優先日	1983年 5 月 5 日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
審判番号	平6-4209		
		合議体 審判長 石田 吉信 審判官 鶴飼 健 審判官 内田 淳子	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド連鎖を利用する検定方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (i) 分析物 (A) の有する分子的認識可能部分を認識して結合することの出来る第 1 部分と、

(ii) 夫々ポリヌクレオチド連鎖からなる 1 またはそれ以上の第 2 部分を有する分子架橋体 (B)

および

(i) 該分子架橋体 (B) のポリヌクレオチド第 2 部分にアニーリングしそれによって安定なポリヌクレオチドハイブリッドを形成することが出来るポリヌクレオチド部分と、

(ii) 1 またはそれ以上の信号発信部分を有する 1 またはそれ以上の信号発信体 (C) を準備すること、

および

該分析物 (A) は該分子的識別可能部分を介して該分子

2

架橋体 (B) の第 1 部分に結合し、該分子架橋体 (B) は該ポリヌクレオチド第 2 部分を介して該信号発信体 (C) のポリヌクレオチド部分にアニーリングされている複合体を形成すること、

および

該複合体中に存在する該信号発信部分により信号を検出すること、

からなる分子的認識可能部分を有する分析物 (A) を試料中で検出する方法。

10 【請求項 2】 該分子架橋体 (B) は 2 以上の第 2 部分からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 3】 認識第 1 部分に対するポリヌクレオチド第 2 部分の数比率は 2 以上である特許請求の範囲 2 に記載の方法。

【請求項 4】 数比率が 5 以上である特許請求の範囲 3 に

記載の方法。

【請求項 5】数比率が10以上である特許請求の範囲 4 に記載の方法。

【請求項 6】2 以上の信号発信体 (C) が準備され、その結果複合体を形成する特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 7】信号発信体 (C) は 2 以上の信号発信部分からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 8】信号発信体 (C) 中のポリヌクレオチド部分に対する信号発信部分の数比率は 2 以上である特許請求の範囲 7 に記載の方法。

【請求項 9】数比率が 5 以上である特許請求の範囲 8 に記載の方法。

【請求項 10】数比率が10以上である特許請求の範囲 9 に記載の方法。

【請求項 11】分子架橋体 (B) 中の該第 2 部分が 2 以上のポリヌクレオチド連鎖、および/あるいは 2 以上の信号発信体 (C) が準備されその結果形成された複合体、および/あるいは該信号発信体 (C) が 2 以上の信号発信部分からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 12】分子架橋体 (B) 中の第 1 部分に対する第 2 部分の数比率が 2 以上、および/あるいは分子架橋体 (B) に対する信号発信体 (C) の数比率が 2 以上、および/あるいは信号発信体中のポリヌクレオチド部分に対する信号発信部分の数比率が 2 以上である特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 13】夫々の数比率が独立して 5 以上である特許請求の範囲 12 に記載の方法。

【請求項 14】夫々の数比率が独立して10以上である特許請求の範囲 13 に記載の方法。

【請求項 15】該分析物は生物学的または非生物学的試料に存在する特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 16】該分析物の分子的認識可能部分は蛋白質様物質である特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 17】該分析物の分子的認識可能部分は核酸からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 18】該分析物の分子的認識可能部分はサッカライドからなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 19】該分析物は抗原、抗体、受容体、ウィルス、ウィルス構成要素、バクテリア、バクテリア構成要素、細胞、細胞構成要素、または試料のいかなる病原性、あるいは非病原性構成要素からなる群から選択される特許請求の範囲 16、17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】該分子架橋体上の該認識第 1 部分はポリヌクレオチド連鎖からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 21】該分子架橋体上の該認識第 1 部分は抗原からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 22】該分子架橋体上の該認識第 1 部分は抗体からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 23】該分子架橋体上の該認識第 1 部分はサッカライドからなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 24】該分子架橋体上の該認識第 1 部分はレクチンからなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 25】該分子架橋体上の該認識第 1 部分はホルモンからなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 26】該分子架橋体上の該認識第 1 部分は受容体からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 27】該分子架橋体上の該認識第 1 部分は酵素阻害物質または酵素補助因子からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 28】該分子架橋体上の該認識第 1 部分は酵素活性位置、補助因子結合位置、または受容体蛋白質からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 29】該分子架橋体上の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分は遺伝子生成物またはそれらの断片に対するコードを有する特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 30】該分子架橋体上の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分は遺伝子またはそれらの断片に対するコードを有しない特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 31】該分子架橋体上の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分はポリデオキシ G、ポリデオキシ C、ポリデオキシ T またはポリデオキシ A 連鎖、またはポリーリボまたはデオキシリボブリン、ピリミジンまたは類似物からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 32】該分子架橋体上の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分はグアノシン残基の豊富な連鎖部分からなる特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 33】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分は他のポリヌクレオチド連鎖に共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 34】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分は抗体に共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 35】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分は抗原に共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 36】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分はサッカライドに共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 37】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分はレクチンに共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 38】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分はホルモンに共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 39】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第 2 部分は受容体に共有結合されている特許請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 40】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連

鎖からなる第2部分は酵素阻害物質または酵素補助因子に共有結合されている特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項41】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は酵素に共有結合されている特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項42】該分子架橋体は環状DNAポリマーである特許請求の範囲20に記載の方法。

【請求項43】該DNAは単一鎖をなす特許請求の範囲42に記載の方法。

【請求項44】該環状DNAポリマーは線状ファージから誘導される特許請求の範囲42に記載の方法。

【請求項45】線状ファージはM13またはその変種である特許請求の範囲44に記載の方法。

【請求項46】該M13ファージはグアノシン残基またはシトシン残基の豊富な連鎖部分を担持する特許請求の範囲45に記載の方法。

【請求項47】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分は遺伝子生成物またはその断片に対するコードを有する特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項48】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分は遺伝子生成物またはその断片に対するコードを有しない特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項49】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分はポリデオキシC、ポリデオキシG、ポリデオキシA、ポリデオキシT連鎖、または低度複雑性の繰返し連鎖からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項50】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分はシトシン残基またはグアノシン残基の豊富な連鎖部分からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項51】該信号発信体はポリヌクレオチドポリマーである特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項52】該ポリヌクレオチドポリマーは自然発生変性DNAである特許請求の範囲51に記載の方法。

【請求項53】該ポリヌクレオチドポリマーはT（均等）ファージから誘導される特許請求の範囲52に記載の方法。

【請求項54】該T（均等）ファージはT<sub>4</sub>である特許請求の範囲53に記載の方法。

【請求項55】該変性DNAはクローン化挿入物を担持する特許請求の範囲52に記載の方法。

【請求項56】該ポリマーは単一鎖をなす特許請求の範囲51に記載の方法。

【請求項57】該ポリマーは線状ファージから誘導される特許請求の範囲56に記載の方法。

【請求項58】該ファージはM13またはその変種である特許請求の範囲57に記載の方法。

【請求項59】該信号発信体の該信号発信部分は放射性ラベル付される特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項60】該信号発信体の該信号発信部分は放射性ラベル付されない特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項61】発信号発信部分は酵素からなる特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項62】発信号発信部分はビオチン部分からなる特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項63】発信号発信部分は蛍光化合物からなる特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項64】該信号発信部分は高電子密度化合物からなる特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項65】発信号発信部分は不溶性相からなるかまたはそれと結合している特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項66】該不溶性相はラテックス粒子、樹脂、またはバクテリアからなる特許請求の範囲65に記載の方法。

【請求項67】該信号発信部分は抗体または抗原からなる特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項68】該信号発信部分はサッカライドまたはレクチンからなる特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項69】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは放射能測定からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項70】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは酵素反応からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項71】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは蛍光測定または電子顕微鏡的測定からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項72】発信号発信部分は信号を含んでいる部分を確認することが出来るポリヌクレオチド連鎖である特許請求の範囲60に記載の方法。

【請求項73】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは抗体／抗原複合化反応からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項74】該信号発信部分による信号を検出する該ステップはビオチンとビオチン結合部分との間の複合化反応からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項75】該部分はアビジン、ストレプトアビジンまたは抗-ビオチン抗体である特許請求の範囲74に記載の方法。

【請求項76】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは高電子密度化合物の検出からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項77】該信号発信部分による信号を検出する該ステップはサッカライドとレクチンとの間の複合化反応からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項78】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは不溶性相上に結合するステップからなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項79】該信号発信部分による信号を検出する該ステップは自然発生変性DNA上のクローン挿入物と分子

架橋体との間の複合化、それに続く変性レクチンの該信号発信体への結合からなる特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項80】該変性DNAはT<sub>4</sub> ファージから誘導される特許請求の範囲79に記載の方法。

【請求項81】該不溶性相はラテックス粒子である特許請求の範囲78に記載の方法。

【請求項82】該分析物の該認識可能部分はポリヌクレオチド連鎖であり、該分子架橋体上の該認識第1部分はそれに対して安定にアニーリングすることが出来るポリヌクレオチド連鎖であり、該分子架橋体は単一鎖をなすDNAポリマーであり、そして該信号発信体上の該信号発信部分による検出の該ステップは非放射性検出に基づく特許請求の範囲1に記載の方法。

【請求項83】該分子架橋体は線状ファージから誘導される特許請求の範囲82に記載の方法。

【請求項84】該信号発信体は線状ファージから誘導される特許請求の範囲82に記載の方法。

【請求項85】I) 密閉部中に1個またはそれ以上の物入れ手段を受け入れるために区画された入れ物

II) (i) 分析物(A)の有する分子的認識可能部分を認識して結合することの出来る第1部分と、

(ii) ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分を有する分子架橋体(B)を含む第1物入れ手段  
および

III) (i) 該分子架橋体(B)の該ポリヌクレオチド第2部分にアニーリングし、それによって安定なポリヌクレオチドハイブリッドを形成することが出来るポリヌクレオチド部分と、

(ii) 信号発信部分  
を有する信号発信体(C)を含む第2物入れ手段とからなる分子的認識可能部分を有する分析物(A)の検出のために使用されるキット。

【請求項86】IV) 該信号発信手段からの信号を検出するために必要とされる構成要素を含む第3物入れ手段を更に設けた特許請求の範囲85のキット。

【請求項87】該分子架橋体上の該認識第1部分はポリヌクレオチド連鎖からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項88】該分子架橋体上の該認識第1部分は抗原からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項89】該分子架橋体上の該認識第1部分は抗体からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項90】該分子架橋体上の該認識第1部分はサッカライドからなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項91】該分子架橋体上の該認識第1部分はレクチンからなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項92】該分子架橋体上の該認識第1部分はホルモンからなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項93】該分子架橋体上の該認識第1部分は受容

体からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項94】該分子架橋体上の該認識第1部分は酵素阻害物質または酵素補助因子からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項95】該分子架橋体上の該認識第1部分は酵素活性位置または補助因子結合位置からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項96】該分子架橋体上のポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は遺伝子生成物またはその断片に対するコードを有する特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項97】該分子架橋体上のポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は遺伝子生成物またはその断片に対するコードを有しない特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項98】該分子架橋体上のポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分はポリdG、ポリdC、ポリdT、ポリdA連鎖または低度複雑性(繰返し)ポリヌクレオチドからなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項99】該分子架橋体上のポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分はグアノシン残基を豊富に含む連鎖部分からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項100】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は他のポリヌクレオチド連鎖に共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項101】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は抗体に共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項102】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は抗原に共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項103】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分はサッカライドに共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項104】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分はレクチンに共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項105】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分はホルモンに共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項106】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は受容体に共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項107】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は酵素阻害物質または酵素補助因子に共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項108】該分子架橋体中の該ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分は酵素に共有結合される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項109】該分子架橋体は環状DNAポリマーである特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項110】該環状DNAは単一鎖をなす特許請求の

10

20

30

40

50



範囲109に記載のキット。

【請求項111】該環状DNAポリマーは線状ファージから誘導される特許請求の範囲110に記載のキット。

【請求項112】該線状ファージはM13またはその変種である特許請求の範囲111に記載のキット。

【請求項113】該M13ファージはグアノシンまたはシトシン残基を豊富に含む連鎖部分を担持する特許請求の範囲112に記載のキット。

【請求項114】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分は遺伝子生成物またはその断片に対するコードを有する特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項115】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分は遺伝子生成物またはその断片に対するコードを有しない特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項116】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分はポリdC、ポリdG、ポリdA、ポリdT連鎖または繰返し低複雑性ポリヌクレオチドからなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項117】該信号発信体上の該ポリヌクレオチド部分はシトシンまたはグアノシン残基を豊富に含む連鎖部分からなる特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項118】該信号発信体は環状DNAポリマーである特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項119】該DNAは単一鎖をなす特許請求の範囲118に記載のキット。

【請求項120】該DNAは線状ファージから誘導される特許請求の範囲119に記載のキット。

【請求項121】該ファージはM13またはその変種である特許請求の範囲120に記載のキット。

【請求項122】該信号発信体上の該信号発信部分は放射性ラベル付される特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項123】該信号発信体上の該信号発信部分は放射性ラベル付されない特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項124】該信号発信部分は酵素からなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項125】該信号発信部分はビオチン部分からなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項126】該信号発信部分は蛍光物質からなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項127】該信号発信部分は高電子密度化合物からなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項128】該信号発信部分は不溶性相からなるかまたはそれと結合している特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項129】該不溶性相はラテックス粒子、樹脂、またはバクテリアからなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項130】該信号発信部分は抗体からなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項131】該信号発信部分はサッカライドからなる特許請求の範囲123に記載のキット。

【請求項132】該分析物上の該認識可能な部分はポリヌクレオチド連鎖であり、該分子架橋体上の該認識第1部分はそれに安定にアニーリングすることの出来るポリヌクレオチド連鎖であり、該分子架橋体は単一鎖をなすDNAポリマーであり、そして該信号発信体上の該信号発信部分は非放射性検出にもとづく特許請求の範囲85に記載のキット。

【請求項133】該分子架橋体は線状ファージから誘導される特許請求の範囲132に記載のキット。

【請求項134】該信号発信体は線状ファージから誘導される特許請求の範囲132に記載のキット。

【請求項135】(i)分析物(A)の有する該分子認識可能部分を認識して結合することの出来る第1部分と、

(ii)夫々ポリヌクレオチド連鎖からなる1またはそれ以上の第2部分を有する分子架橋体(B)

および、

(i)該分子架橋体(B)の該ポリヌクレオチド第2部分にアニーリングし、それによって安定なポリヌクレオチドハイブリッドを形成することが出来るポリヌクレオチド部分と、

(ii)1またはそれ以上の信号発信部分を有する1またはそれ以上の夫々の信号発信体(C)からなる組成物。

【請求項136】該分子架橋体(B)は2以上の第2部分からなる特許請求の範囲135に記載の組成物。

【請求項137】認識第1部分に対するポリヌクレオチド第2部分の数比率が2以上である特許請求の範囲136に記載の組成物。

【請求項138】数比率が5以上である特許請求の範囲137に記載の組成物。

【請求項139】数比率が10以上である特許請求の範囲138に記載の組成物。

【請求項140】分子架橋体(B)に対する信号発信体(C)の数比率が2以上である特許請求の範囲135に記載の組成物。

【請求項141】数比率が5以上である特許請求の範囲140に記載の組成物。

【請求項142】数比率が10以上である特許請求の範囲141に記載の組成物。

【請求項143】1またはそれ以上の信号発信体(C)中のポリヌクレオチド部分に対する信号発信体部分の数比率が2以上である特許請求の範囲135に記載の組成物。

【請求項144】数比率が5以上である特許請求の範囲143に記載の組成物。

【請求項145】数比率が10以上である特許請求の範囲144に記載の組成物。

【請求項146】該分子架橋体(B)が2以上の第2部分からなるか、および/あるいは該組成物が2以上の信号発信体(C)、および/あるいは2以上の信号発信部分からなる特許請求の範囲135に記載の組成物。

【請求項147】分子架橋体(B)中の第1部分に対する第2部分の数比率が2以上、および/あるいは分子架橋体(B)に対する信号発信体(C)の数比率が2以上、および/あるいは信号発信体(C)中のポリヌクレオチド部分に対する信号発信部分の数比率が2以上である特許請求の範囲146に記載の組成物。

【請求項148】夫々の数比率が独立して5以上である特許請求の範囲147に記載の組成物。

【請求項149】夫々の数比率が独立して10以上である特許請求の範囲148に記載の組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

本発明はポリヌクレオチド相互作用にもとづく一般的な検出システムを利用する分析物の免疫検定および核酸検定の両者を含む検定に関するものである。

生物学および非生物学試料における物質の微量の分析および検出は全世界の臨床および分析研究所における日常の業務になっている。大ざっぱに言えば、分析手法は配位子-受容体相互作用にもとづくもの（即ち免疫検定にもとづいた手法）、および核酸ハイブリッド化にもとづくもの（ポリヌクレオチド連鎖にもとづく手法）とに分けられることが出来る。

例えば、免疫検定手法は手順中のあるステージまたはステップにおいて、抗体結合位置とこれに対する補体となる抗原との間の非共有結合を含むものである（例えば、T.Chard著“An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques”North Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 1978参照。）ポリヌクレオチド連鎖にもとづく手法において、方法は、あるステップまたは他のステップにおいて、ハイブリッド化条件下に補体となる連鎖に対するポリヌクレオチド連鎖の非共有結合を含むものである（例えば、Falkow他、米国特許第4,358,535号、Wahl他、米国特許第4,302,204号、およびHeimer、米国特許第3,755,086号参照。）

一般に広められている動向においては、上記の手法は両方共正確な分子配列や相互作用によって成し遂げられ、そして非共有結合自由エネルギー（例えば水素結合、分散結合、イオン結合、双極子結合等）の放出によってエネルギー的に与えられる第1認識事象を含んでいる。該第1認識事象に加えて、上記の手法は両方共、一つのステップまたは他のステップにおいて、信号を発する事象を含むものである。このステップまたは事象は、人手または装置検出システムに対するいくらかの証明出来る方法において、第1認識事象を検出する必要性に関するものである。

信号発信は主として二つの広い分野、放射能および非放射能手法に集中する。

放射能信号はシステムにおいて例えば $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 等の原子による一つまたはそれ以上の放射性ラベル付けに依存する。検出は通常放射性検出体による。非放射性手法はこれらが放射能を含まず、かくしてこのような手法をより安全に、よりきれいに、そして貯蔵に対してより安定にせしめるのでこの数年の間にますます使われるようになった。これらは放射性ラベル手法と同程度の高い感度を持つように発展されて来た。現在用いられている最も一般的な非放射性信号発信手法には酸素結合された免疫検定（例えばSchuurs, A.H. 他, *Clinica Chimica Acta*, 81:1~40 (1977)）、蛍光（Bauman等, *Chromosoma*, 84:1~18 (1981)）、間接免疫蛍光（Rudkin等, *Nature*, 265:472~473 (1977)）、アビジン-ビオチン相互作用（Manning, J. 等, *Biochemistry*, 16:1365~1370 (1977)）、例えばフェリチンのような高電子密度核の電子顕微鏡検査（Broker, T.R. 等, *Nucleic Acids Research*, 5:363~384 (1978)）、ラテックス接触（Sodja, A. 前掲, 35:385~401 (1978)）、上記手法の組合せ、そしてその他のものがある。

第1認識事象と信号発信事象は直接または間接に、比率的にまたは逆比例的に相互に関係付けられることを必要とする。かくして放射性ラベルされたプローブとの核酸のハイブリッド化のようなシステムにおいて、放射能の量は通常存在する分析物の量に直接比例する。検出されるラベルを付された第2抗体の量が正常には試料中に存在する抗原の量に直接比例するサンドイッチ免疫検定のようなシステムでは同様なことが云える。逆比例手法は例えば検出される信号の量が試料中に存在する分析物の量が増えると減少する競合免疫検定を含む。

従来技術はまた信号発信事象が1:1よりも大きな比率で第1認識事象と関連する増巾手法を利用して来た。かくして、検定の信号発信成分は各認識成分に対して10:1の比率で存在するであろう。

ポリヌクレオチド連鎖にもとづく認識システムの広汎な多用性はなされるべき実験と研究を広範囲に拡大する。この多用性は補体ヌクレオチド塩基相互の正確な配列、チミジン(T)に対して配列するアデニン(A)およびシチジン(C)に配列するグアニン、によってもたらされるものである。この相補性が与えられれば無限に多方面にわたるシステムを提供するためにいかなる所望の連鎖を利用することも可能になる。

ポリヌクレオチド相互作用にもとづくシステムのより広汎な用途に対する障害の一つは、しかしながら、信号発信または報告グループ（例えば放射性標、または酵素、またはビオチン等）をポリマー鎖中の個々のヌクレオチド残基に結合する必要性があったことである。この要求から少なくとも二つの問題が生ずる。

第1はポリヌクレオチドポリマーの変性に含まれる化学反応条件が一般的にとりわけいかなる1つの核酸を充分に選択するためには激し過ぎることである。例えば、

ケトキザールまたはグリオキザールのようなジカルボニル試薬はグアニンと無差別に反応するであろう。(例えば, Shapiro, R. 等, Biochemistry, 5:2799-2807 (1966), Lill, M., 前掲, 8:3249-3253 (1969), または Politz, S.M. 等, 前掲, 20:372-378 (1981)) 参照。)

かくしてもしジカルボニル基盤の架橋剤が酵素または低分子信号発信成分を直接ポリヌクレオチド鎖に結合するために用いられるならば鎖中のすべてのグアニン残基の可成りの量が変性する危険性があるであろう(実際このようなことはある)。このことは認識ステップにおいてこのような変性された鎖の使用を甚大に妨げる。この問題は従来技術において、個々の変性されたヌクレオチド(予じめ非水素結合分裂方法で変性された)を発生期のポリヌクレオチド鎖の中への酵素的な(DNAポリメラーゼを基盤とする)取り入れの使用によって解決されていた。しかしながら、最終ポリヌクレオチドそれ自体についての化学的変性手法を利用することが望ましい。

第2の問題は信号発信グループをポリヌクレオチドに結合することに関連し、第1の問題にいくぶんかは関係している。該問題は、ポリマー中へのこれら酵素的取り入れに先立って時には非常に複雑なそして手のこんだ合成技術による合成の必要性にもとづくものである。かくして放射性ラベルされたヌクレオチドまたはビオチンラベルされたヌクレオチドは独立して合成されることになる。更に最終核酸ポリマー中への化学的に変性されたヌクレオチドの結合量はまた分析物上の与えられた連鎖を認識するためのプローブの能力に影響する。これはもし信号発信グループが認識グループに大巾に数でまざっている増巾手法が利用されるならば特に重要である。それ故に容易に調整され、化学的変性に対して酵素にもとづく反応よりもむしろ制御しやすい成分を利用し、ポリヌクレオチドにもとづく連鎖の広汎な多用性を利用し、そして信号増巾方法の可能性を含む検定システムを開発することは非常に有用である。

本発明はポリヌクレオチド連鎖認識を利用する一般的な検定システムを提供するものであり、該検定システムは化学的変性反応の使用を可能とし、またいかなるタイプの非結合相互作用にもとづく認識事象を利用することが出来、そして有効な信号発信方法の無数のうちのいかなるものも用いることが出来るものである。

本発明の手順は

(i) 分析物(A)の有する分子的認識可能部分を認識して結合することの出来る第1部分、および

(ii) ポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分を有する分子架橋体(B)

および

(i) 該分子架橋体(B)のポリヌクレオチド第2部分にアニーリングすることが出来るポリヌクレオチド部分、および

(ii) 信号発信部分

を有する信号発信体(C)を準備すること、

および

該分析物(A)は該分子的認識可能部分を介して該分子架橋体(B)の第1部分に結合し、該分子架橋体(B)は該ポリヌクレオチド第2部分を介して該信号発信体(C)のポリヌクレオチド部分にアニーリングされている複合体を形成すること、

および

該複合体中に存在する該信号発信部分により信号を検出すること、

からなる分子的認識可能部分を有する分析物(A)を試料中で検出する方法よりなるものである。

上記手順に加えて本発明は例えば種々な分子架橋体や種々な信号発信体のようなそれに用いられるべき種々の要素や成分を該架橋体や発信体からなるキットや該手順に用いられる他の成分と同様に提供するものである。

本質において、本発明は多重成分検定システムの認識部分および信号発信部分がシステムの異なった成分上に存在し、それによってそれらを分離しそして認識部分上の信号発信部分の妨害を防止するべきであると云う理解にもとづいている。この多重成分体への分離はまた認識成分に影響することなくして成分の一つに化学的変性手法によって結合せしめることを可能にする。

該手順、システム、および成分の用途は限定されるものではなく、そして一般的にいかなる試料中の認識することが出来るいかなる分析物の検出のみならず従来の検定手法が適用されてきた用途のすべてを含むものである。

本発明の明細書および特許請求の範囲において用いられる“分析物”なる言葉は検出されるべき、そして所望なれば定量されるべき単一物もしくは混合物におけるいかなる物質または複数の物質を含むものである。該分析物は小さなまたは高分子量の分子、分子複合体、または例えばウイルス、細胞、または細胞群のような生物系であろう。一般的な分析物としては蛋白質、ポリサッカライド、リボポリサッカライド、蛋白質複合体、核酸またはそのセグメント、単一らせん形状または二重らせん形状のいずれか、例えばコアまたはカプシド、種々の異なったタイプのバクテリア、組織細胞等のようなすべてのウイルスまたはウイルス成分がある。最も一般的な蛋白質には構造蛋白質、酵素、免疫グロブリン、またはその断片がある。最も一般的な核酸は例えば、tRNA、mRNA、rRNA等の種々の異なったタイプのDNAおよびRNAがある。バクテリアは全体、または細胞壁または他の認識可能部分のようなその断片としてグラム陽性およびグラム陰性バクテリアを含む。菌、藻類および他の亜顕微鏡的微生物はまた動物(例えば哺乳類)細胞と同様に含まれる。

該分析物は分子的に認識可能な部分をその上に有するべきである。この相はシステム中の架橋体上の補体分子

部分によって認識されることの出来る分析物のいかなる分子部分をも示すものである。分子認識は当業者には理解されているように、2つの分子の補体部分の間の3つの次元中の非共有結合を含む。ある分析物上の分子的認識可能部分には、例えばRNAまたはDNAのようなその補体連鎖によって認識されるべきポリヌクレオチド連鎖；その対応するモノクローンまたはポリクローン抗体によって認識されるべき抗原部分；その対応する抗原によって認識されるべき抗体部分；その糖によって認識されるべきレクチン部分、そのレクチンによって認識されるべき糖部分、その受容体によって認識されるべきホルモン部分；そのホルモンによって認識されるべき受容体部分；その酵素によって認識されるべき阻害物質部分；その阻害物質部分によって認識されるべき酵素部分；補因子酵素結合位置によって認識されるべき補因子部分；その補因子によって認識されるべき位置部分を結合した補因子酵素；その基質によって認識される結合配位子およびその逆（例えばビオチン-アビジン）；またはいかなるそれらの順列および組合せがある。

最も一般的な分子的認識可能部分には、多くの異なった種類の抗原においての三次元的蛋白質配列、種々の細胞中に存在する細胞壁構造、または生物のDNAまたはRNA中に存在する核酸連鎖がある。

該システムの第2の成分は“架橋体”である。この架橋体は分析物上の分子的認識可能部分を認識することの出来る第1部分と、そしてポリヌクレオチド連鎖からなる第2部分のみを含むことを必要とする。該架橋体のこれら2つの部分は同じタイプ（即ち異なったものとは云えどもその両方共がポリヌクレオチド連鎖）または異なったタイプ（例えば一つが抗体部分であり、他がポリヌクレオチド部分である）のものであろう。

分析物上の分子的認識可能部分を認識することが出来る架橋体の部分は分析物上の認識可能部分の補体である分子または分子断片を含まねばならない。それ故にもし分析物がポリヌクレオチド連鎖を含んでいるならば、該架橋体の認識部分は補体ポリヌクレオチド連鎖または“プローブ”であるべきである。もし分析物上の分子的認識可能部分が広く一般に使用されている抗原であれば、該架橋体上の認識部分はそれに対する抗体である。糖/レクチン、受容体/ホルモン、阻害物質/酵素等の前記された補体対に関しても同様なことが云える。

該分子架橋体の第2部分は一つのポリヌクレオチド連鎖からなる。該ポリヌクレオチド連鎖は、与えられた厳重な条件下で補体連鎖との安定なアニーリングを与えるに充分であること、それが信号発信体上のポリヌクレオチド連鎖の補体となること、そしてもし該架橋体上の認識部分がそれ自体ポリヌクレオチド鎖であるならば、分析物連鎖と架橋体上の第2ポリヌクレオチド部分との間のハイブリッド形成を避けるためにそれが該認識連鎖部分から充分に相違することが備えられたいかなる選択さ

れた連鎖ともすることが出来る。該三つの条件の後者は悪い結果を生ずる付随物によって分子混同を防ぐことが必要である。

架橋体上の第2部分ポリヌクレオチド連鎖（即ち信号発信体上の連鎖に対する一つの補体）は一つもしくは複数の特殊遺伝子生成物に対するコードを有するか、または遺伝子生成物に対するコードを全く有しないであろう。かくしていかなる構造遺伝子またはその部分も架橋体上のポリヌクレオチド連鎖部分として用いられることが出来るであろう。望ましい連鎖は、しかしながら、このようなコードを有することは分析物中に存在する補体遺伝子連鎖に干渉するものであるから、与えられた遺伝子に対するコードは有しないであろう。かくして例えばポリデオキシG、ポリデオキシA、ポリデオキシGT、ポリデオキシGA、ポリデオキシGAT、ポリデオキシGTA、または他のいかなる複合（繰返し）連鎖からなる連鎖のような分析物上の連鎖に対するコードを有さずして補体でありそうもない架橋体上のポリヌクレオチド連鎖を選択することが望ましい。“ポリヌクレオチド”の意味には、ポリリボヌクレオチド、ポリデオキシリボヌクレオチドまたはいかなるポリープリン、ピリミジン、またはそれらの類似物およびそれらの結合が含まれる。

本発明において用いられる架橋体の特殊な例はポリヌクレオチドとモノクローンまたはポリクローン抗体、蛋白質抗原とポリヌクレオチド、サッカライドとポリヌクレオチド、小分子量有機化合物とポリヌクレオチド、レクチンとポリヌクレオチド、受容体とポリヌクレオチド、ホルモンとポリヌクレオチド、酵素阻害物質とポリヌクレオチド、酵素補因子とポリヌクレオチド、およびこれらの組合せもしくは順列との共有結合されたものである。

架橋体上の認識部分のポリヌクレオチド連鎖部分に対する分子比率は1:1であることを必要としない。認識部分より以上のポリヌクレオチド連鎖部分が存在するかあるいはその逆もあるであろう。ポリヌクレオチド連鎖部分の架橋体上の認識部分に対する比率は1よりも大きく、例えば5、10またはそれ以上である場合には、システムは比率に等しい因子によって第1認識を増加する。

本発明の好ましい架橋体には単一または二重らせん形状をなすDNAの環状ポリマーがある。単一らせん形状のものは例えばfd、f1およびM13のようないわゆる線状ファージを含んでいる（Van Wezenbeek, P., Gene, 11:129 (1980) 参照）。これら線状ファージはこれらの宿主を分離させない。むしろこれらは細胞が生長と分化を続けるので感染した細胞から解放される。M13は市場で入手可能であり（Bethesda Research Labs, Inc.）、そしてクローン化および連鎖化システムとして広く用いられて来ている。それはその中へいかなる所望のポリヌクレオチドプローブ連鎖を取り入れるために、架橋体の認識部分としての役目を果たすために制限エンドヌクレアーゼ位置で

切断されることが出来る。同じ位置または異なった位置のいずれかで、該環状DNAは架橋体のポリヌクレオチド部分と結合を開始して信号発信部分上の補体部分にアニーリングすることが出来るようになる。この様式においてはハイブリッド化による分析体上の遺伝子連鎖を認識することが可能であり、そしてまた他の連鎖を介して信号発信体アニーリングすることが可能である架橋体が得られる（この種類の一般化システムは第2図に示される）。

一つの特に好ましい実施例においては、該架橋体は与えられた遺伝子（例えばHepatitis Bウイルス、EBV等のウィルスプロンプ）に対する連鎖、およびポリマーの他の部分にはポリG、またはポリGT、またはポリdG、またはポリdC、またはポリdCA、またはポリdGdTポリヌクレオチド部分を担持するDNAポリマーからなる。理想的には単一らせん形状をなすDNAポリマーは信号発信体へのアニーリング可能なポリヌクレオチド部分（例えばポリdGT）を担持すること、そしてまた使用物がその中へいかなる所望のDNAプローブも取り入れることが出来るような制限エンドスクレーパー位置を担持することをもたすことが出来る。この様式においては、いくらかの単一酵素的操作によって、該DNAポリマー架橋体は広い範囲の架橋体の中へ迅速に変換されることが出来る。本発明の信号発信体は架橋体上の補体部分に対してアニーリングすることの出来るポリヌクレオチド部分および信号発信部分の両方を担持する必要がある。

信号発信体上のポリヌクレオチド部分は分子架橋体上の補体部分と同じパラメーターによって定義される。架橋体上の相当するポリヌクレオチドによる安定なポリヌクレオチドハイブリッドを形成することが出来る長さのものであるべきである。本発明のこの部分において用いられるようなアニーリングは厳密な条件のいかなる与えられ一組の下において、二つの補体ポリヌクレオチドらせんの間の要求される塩基対の結び付きを云う。この分野において一般に一つの列において約12から13のヌクレオチドが安定なアニーリングに対して必要とされる。かくして最小、連鎖中のヌクレオチドの数は架橋体のポリヌクレオチド部分に安定にアニーリングするために必要なだけにすべきである。ハイブリッドの形成はハイブリッド化の後に続くいかなる洗滌、流し出し、または信号検出過程に対しても充分安定であるべきである。

該信号発信体の“信号発信”部分は事実上従来用いられている信号発信システムおよび将来において開発されるべきいかなるシステムも含むことが出来る。それはそれ自体信号を発信する部分（例えば放射性ラベル）、または更に反応または操作することによって信号を生ずる部分（例えば酵素-結合システム）からなる。両方のタイプ共、こゝでは“信号発信”部分と呼ばれる。

かくして該信号発信部分は放射性ラベル（例えば $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 等）、酵素（例えばパーオキシダーゼ、アルカリ

または酸ホスファターゼ等）、バクテリアラベル、蛍光ラベル、抗体（二重抗体システムにおいて用いられるであろう）、抗体（ラベルされている抗体と共に用いられるべきである）、ビオチンのような低分子（アビジン、ストレプトアビジン、またはアンチビオチンシステムと共に用いられるべきである）、ラテックス粒子（浮揚力またはラテックス接着システムにおいて用いられるべきである）、フェリチンのような高電子密度化合物（電子顕微鏡検査において用いられるべきである）、またはこれらの組み合わせまたは順列からなるであろう。

例えば、もし信号発信体の信号発信部分が抗原である場合、信号は該抗原と一つの抗体/酵素結合体との複合、その後の酵素基質の添加によって発信させることが出来る。もし信号発信体の信号発信部分が抗体であったならば、信号は抗-抗体または蛋白質Aのような蛋白質を結合しているF<sub>c</sub>の複合化によって発信させられることが出来、第2抗体または蛋白質Aは酵素に対になって結合せられている。

望ましい信号発信部分にはビオチン/アビジンシステムにもとづくものがある。このシステムは種々の手段によって信号の中へ取り入れられることが出来る。例えば、該信号発信体のポリヌクレオチド部分はチトクロームc架橋を介してビオチンに共有結合することが出来る（Manning等、Biochemistry, 16:1364~1370 (1977)、Manning等、Chromosoma, 53:107~117 (1975)、Sodja, A., Nucleic Acids Research, 5:385~401 (1978)）、または該ビオチンは固有ヌクレオチド残基の中へ共有結合物に取り入れられることが出来る（Langer, P. R., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78:6633~6637 (1981)、また該ビオチンはジアミン（例えばペンタンジアミン）によってポリヌクレオチドに結合されることが出来る（Broker, T. R. 等、Nucleic Acids Research, 5:363~384 (1978)）。信号発信部分におけるビオチン分子とアビジン、ストレプトアビジンまたは抗ビオチン抗体との相互作用はその後行なわれ、アビジン、ストレプトアビジンまたは抗体がラテックス粒子（Sodja, A. 等、上記、またはManning等、Chromosoma, 上記）、フェリチン（Broker, 上記）、フルオレセインのような蛍光物質、酵素等のような信号発信成分と対になって結合される。

ビオチン/アビジン基盤および非ビオチン/アビジン基盤の両方の種々な非放射性信号発信システムの完全な記述は二つの現在継続中の特許出願において見出すことが出来る。（Ward等による1981年4月17日米国特許庁出願の米国特許出願第255,223号“Modified Nucleotides and Methods of Preparing and Using Same”、およびEngelhardt等による1982年6月23日米国特許庁出願の米国特許出願第391,440号“Modified Nucleotides, Methods of Preparing and Utilizing, and Compositions Containing the Same”）そしてこの特許出願の両方ともこゝに

参照によって完全に取り入れられている。

加うるに、該信号発信体の信号発信部分はいかなる方法によっても化学的に変性または、人工的に改変されているポリヌクレオチドであることを必要としない。ある生物学的システムはこのシステムによって利用され得る生体内変性を行なうものである。このようなシステムの一つはE. coliにおいて成長せしめられたファージT<sub>4</sub>である。T<sub>4</sub> DNAはグリコシル化されているC残基の非常に高い含有量を有する。低度複雑性繰返しポリヌクレオチド連鎖(クローン)をファージT<sub>4</sub>の中へ挿入することは可能である。その後、このファージは宿主において自然に繁殖せられそしてグリコシル化せられる。ウィルスDNAはE. coliから単離せられそして架橋部分上の補体連鎖に結合せしめられる。検出はその後、レクチン/酵素システム、またはレクチン/蛍光染料、またはレクチン/高電子密度物質、またはレクチン/放射性ラベルを介してT<sub>4</sub> DNA上の自然グルコース残基を投錨点として用いて達成せられることが出来る。例えばT<sub>4</sub>, T<sub>6</sub>, またはT<sub>8</sub>のような他のT (均等) ファージがまた用いられる。

信号発信部分の数は該信号発信体上のポリヌクレオチド部分の数と化学量論的に1:1である必要はない。該信号発信体の信号発信部分におけるポリヌクレオチド部分に対する信号発信部分の比が1よりも大きな時(例えば5または10より大きい時)、該システムは増巾システムとして作用している。かくして例えばもし信号発信体においてポリヌクレオチド部分に対して10の信号発信部分が存在するならば、架橋体をおおって10:1信号増巾が得られる。もし、加うるに、架橋体がそれ自体信号増巾システムを有するならば、即ち架橋体上の認識部分に対するポリヌクレオチドの比率が1よりも大きいならば、すべての信号増巾システムは両方の比率の積である。このことは分析物の水準で発生するすべての第1認識事象に対して増巾が迅速に増大して非常に鋭敏なシステムを導びくことを意味している。この因子はシステム構成要素の設計によって容易に制御され得る。

#### 調製の手順

前述したように該架橋体は認識部分とポリヌクレオチド部分とからなることが必要である。該信号発信体はポリヌクレオチド部分および信号発信部分を必要とする。かくして一般には、該システムにおいて個々の成分の調製方法はポリヌクレオチドまたは個々の成分の1) 蛋白質部分、2) サッカライド部分、3) 他のポリヌクレオチド部分、4) 低分子量化合物(例えば分子量約1000以下の)、5) 放射性ラベル、または6) 例えばバクテリア粒子またはラテックス粒子のような不溶性相に対する共有結合に関係するだろう。それ故、核酸のそれらの相当する一つまたは複数の相手との共有結合または対をなす結合の中に含まれる化学はよく知られた技術の範囲の中にある。

ポリヌクレオチド連鎖の蛋白質に対する共有結合はま

た文献中に充分記載されている。通常、該反応はカルボジイミド架橋(Halloran, M. K., J. Immunol. 373 (1966))によって、またはホルムアルデヒド(例えばBrullag, D.等, Biochemistry, 8:3214~3218 (1969), Mannin g, J. E.等, Chromosoma, 53:107~117 (1975) をみよ)、(4-アジドフェニール)グリオキザール(Politz, S. M., Biochemistry, 20:372~378 (1981))のような試薬の存在下の核酸に対する蛋白質の架橋によってポリヌクレオチドの2', 3'-ハイドロキシル末端の酸化、次いで  
i) 蛋白質のアミノ基とのシッフ塩基形成、そしてii) ポロハイドライド反応(Sodja, A.等, Nucleic Acids Research, 5:385~401 (1978))によって直接に行われる。他の方法はDNAの直接ブロム化(Jones, A. S., Nature 183:1603 (1959))それにつづくジアミノヘキサンとの反応(Lowe, C. R., Eur. J. Biochem. 73:265~274 (1977))そして蛋白質カルボキシル官能基を介しての対になる結合、またはシトシン部分の水銀化(Dale, R. M. K.等, P. N. A. S., 70:2263~2242, (1973))、それに続くハロゲン化(Dale, R. M. K.等, Nucleic Acids Res., 2:915~930 (1975))、ジアミノヘキサンとの反応そして蛋白質カルボキシル基との対になる結合を含むものである。

特に興味があるのは、該信号発信体の調製において、グアニン塩基の化学変性のためのジカルボニル試薬の使用である。これは現在の多重成分検定システムの特に有用な利点の一つを示す。もし信号発信体上のポリヌクレオチド部分が非常に低いG含量を有するならば、当のポリヌクレオチド部分のアニリング特性の非可逆変性のおそれなくして、該ポリヌクレオチド部分を例えばジカルボニル化合物のような架橋剤を介していかなる物質とも化学的に反応させることが可能である。このことはいかなる小分子量分子のポリヌクレオチド部分とのジカルボニル化合物または他の非識別架橋の使用による結合に対して等しく好都合に適用されるものである。この手法は個々のヌクレオチド残基を予かじめ変性しそしてその後酵素重合によってポリヌクレオチドらせんの中へこれらを取り入れると云うような労力と時間とを節約するものである。

ポリヌクレオチド連鎖のサッカライドに対する結合はCramer等, Chem. Ber 92:384~391 (1959)によって行われることが出来る。20以内のサッカライド単位を有するサッカライドが望ましい。

ポリヌクレオチド連鎖の他のポリヌクレオチド連鎖に対する結合は例えば短太な終端の結紮またはエンドヌクレアーゼ分解酵素によって生ずる結合力を有す末端の存在にもとづく結紮を用いて、化学的または酵素的手法のいずれかによって行なわれ得る。DNA連鎖の相互分割および結紮はHellingおよびLomax, "The Molecular Cloning of Genes-General Procedures", Chakrabartyによる

"Genetic Engineering"の第1章, CRC Press, 1978, Pag

es 1~30に詳細に述べられている。

ポリヌクレオチドのポリヌクレオチドに対する結合のための他の方法はSS Dna+Ribo dUTP+末端トランスファラーゼ (Roychoudery, R. + Wu, R., in Meth. in Enz., LX V, 43, (1980)) ; 過ヨウ素酸塩酸化, 1,6ジアミノヘキサン (1), 3-アミノプロピオン酸 (2), またはビス (2-アミノエタンチオール) (3) を含むアミノ誘導体との還元アミノ化 (Perikch, I Mach, S. および Cuatrecasas, in Meth. in Enz., XXXIV, 82 (1974)) ; またはCの制限ブロム化 (水銀化を介して) (Dale および Ward 上記参照) そしてそれに続くDNAの同様の試薬 ( (1), (2) + (3) ) との反応を用いることを含む。

上記化合物 (1) または (2) のDNA誘導体はこれに続いて水溶性カルボジミド誘導体を介して蛋白質と対に結合される (Inman, J. K. in Meth. in Enz., XXXIV, 52~53, (1974))。 (3) の場合には、該蛋白質はプロモ酢酸のN-ハイドロキシサクシンイミドエステルによって活性化され得る。得られた活性化蛋白質は室温でチオール化核酸と共有的に結合させることが出来る。

例えば<sup>32</sup>Pのような放射性ラベルのDNA連鎖の中への共有結合による取り入れは例えば酵素重合による放射性ラベルされているヌクレオチドの直接結合、逆移翻訳等のような種々の方法のいずれによってもなされることが出来る (Rigby等, J. Mol. Biol. 113:237~251 (1977))。

例えば蛋白質/ラテックス結合体、蛋白質/フェリチン結合体、抗体/酵素結合体、蛍光物質/抗体結合体、アビジン/酵素結合体等のような信号発信システムの個々の要素の調製はこの技術分野ではよく知られておりそして以下の詳細な説明には記述されないであろう。

個々のポリヌクレオチド連鎖の特別な調製はまた当業者にはよく知られている。例えば、もし一つのポリヌクレオチド連鎖が1つまたは複数の遺伝子からなっているならば、合成方法または逆トランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写して補体DNAを生ずることによってそれが調整され得る。もし該ポリヌクレオチド連鎖がいかなるヌクレオチドのらせん (例えばポリdGまたはポリdC) またはいかなるジヌクレオチド対 (例えばポリdGT等) からなるものであれば、それは例えばDNAポリメラーゼを用いることにより、また合成方法論によって容易に調整され得る。

#### 使用方法

検出されるべき分析物は例えば血液、尿、糞便、だ液、うみ、精液、血清、その他の組織、発酵肉汁、培地等の臨床試料のようないかなる生物学的または非生物学的試料中に存在し得る。もし必要であれば、該分析物はその混合成分から分析物の特別なタイプのものを濃縮するために知られた方法によって予備抽出または精製される。例えば、もし分析物が蛋白質または蛋白質含有フラクションであれば、例えば塩沈澱、アルコール沈澱またはク

ロマトグラフのような蛋白質抽出方法が利用され得る。もし分析物が同定されるべき核酸セグメントからなっていれば、例えばフェノール抽出のような核酸抽出方法が利用され得る。該分析物は、もしこのような場合もあるならば精製されていない材料と共に、精製されながら該混合物中で試験されることが出来る、また特にそれが核酸セグメントである場合には固定されることが出来る (例えば、Wahl等、米国特許出願4,302,204をみよ)。

該分析物を含むと思われる細成物はある時間、分析物の認識可能部分と架橋体上の認識部分との間の複合化を行わしめるに充分な条件下で貯置される。これらの条件は分析物と架橋体の性質および量によって種々に変化する。通常は複合化が起った後に、該試料は中性溶液で洗滌して過剰の架橋体を除去する。これに代えて、このステージでは洗滌を行わずに信号発信体は混合物に添加してそして架橋体上のポリヌクレオチドらせんと信号発信体上のそれとの間にアニーリングが起った後に洗滌が行われる。該架橋体らせんの該信号発信らせんとのハイブリッド化はハイブリッド化条件下でそして厳密な条件のいかなる組み合わせの下で行われる。最後の洗滌は信号の発信に先立って必要であろう。

信号発信は信号発信システムの性質によっていづれかの与えられた手法によって行なう。かくしてもし酵素結合検定が利用されるならば、分析物、架橋体そして信号発信体間の三成分からなる複合体は酵素担持試薬 (例えば酵素/抗体結合体) と共に貯置せしめられ、そして基質は発色のためにそこへ添加される。それに代えて、酵素は信号発信体上のポリヌクレオチドらせんに直接に結合され、この場合には基質は直接に添加されてその後発色が得られる。もし該信号発信体の信号発信部分がビオチン部分であれば、アビジン、ストレプトアビジンまたは抗-ビオチン抗体のようなビオチン反応分子がそれに添加される。該ビオチン反応分子は酵素、蛍光化合物、高電子密度化合物、または不溶性固体相と対になって結合してそして検出が適当な方法で行われる。

#### 応用

本発明のシステムの応用は制限されない。試料中の検出されそして分析されることが望まれるいかなる分析物にも本発明の方法を行なうことが出来る。例えば該システムは分析物中の認識可能部分および認識部分、および架橋体の夫々いかなる種類のものを用いることによって微生物検出および同定のために用いられ得る。

特に興味あることは、ウィルスおよびバクテリアDNA連鎖の検出および同定である。

該方法は遺伝的不調が併なわれるDNA遺伝子連鎖に対するポリヌクレオチド補体を調整し、そしていづれかの第1認識事象の存在を測定することによって遺伝的不調の診断に利用することが出来る。これら遺伝的疾患としては、例えば、サラセミアをあげることが出来る。サラセミアの判定はオリゴヌクレオチドのゲノムDNAに対

23

するハイブリッド化、それに続いて固有洗滌方法または制限分析およびサザーン、ノーザンまたはドットプロットによって（既知の遺伝欠陥に対して）なされることが出来る。

本発明のシステムに対する他の用途は染色体上に位置する特定の遺伝連鎖の一連に対して対をなす変性ポリヌクレオチドの一連を用いること、そしてその後その上の第1認識事象を測定することからなる染色体核型決定に存する。

他の用途は架橋体中に存在するホルモン受容体結合成分を受容体位置に結合すること、そしてその後本発明の信号発信システムによって第1認識事象を測定することからなる細胞表面上のホルモン受容体位置の同定または位置決定のための方法を含む。

他の用途は疑がいのある被検体の血液または血清中の例えばCEA（悪性腫瘍の胚に対する抗原）のような癌に関連する抗原の存在を検出することによる癌の診断からなる。他の用途は本発明の手法によって正常受容体の不存在を検出することによって悪性細胞を同定することからなる腫瘍または癌細胞の同定または検出方法を含む。

他の用途は分子架橋体中の認識部分としてその代りに抗原を用いることによって動物中のある伝染性疾病に対する抗体を検出する方法を含む。糖水準または特異なグリコシル化されているヘモグロビン水準は分子架橋体上の認識部分としてのレクチンを用いて糖尿病の判定をすることが出来る。

更に本発明の手順およびシステムに対する用途は分析物の不溶化に存する。かくして、もし試料が分析物を含んでいると思われ、そして試料から該分析物を抽出および精製することが望まれるならば、該“信号発信体”は例えば水性不溶性樹脂、ガラス、アクリレートまたはメタクリレートのようなプラスチック、試験管内壁またはその縦孔等の不溶性固体相に特別に結合することからなるか、または結合する能力を有するように設計される。該架橋体は固体相と共に解離され、かくして作られる分析物のための認識位置（即ち親和性表面）はそれからそれに結合される。

本発明は検出および同定手順を行なうために必要な要素の一つまたはそれ以上からなるキットの作成を容易に与えるものである。かくして、キットは密閉部中に例えば試験管、小型びん、フラスコ、ボトル、シリンジ等の一つまたはそれ以上の物入れ手段または一連の物入れ手段をその中の密閉部中に受け入れるために区画された入れ物からなるであろう。該物入れ手段または一連の物入れ手段の第1のものは色々な種類の分析物のいずれかを認識するための架橋体を含むであろう。第2物入れ手段または一連の物入れ手段は信号発信体を含むであろう。第3物入れ手段または一連の物入れ手段は結果が内析されることが出来る標準曲線を作成することが出来るようにする分析物の予じめ検出された量を含むであろう。他

24

の物入れ手段または一連の物入れ手段は例えば酵素結合体、アビチン結合体、フェリチン結合体、ラテックス結合体、蛍光物質結合体等の信号を発信するために必要な要素を含むであろう。

望ましい実施例においては、該キット入れ物は予備検出される連鎖のポリヌクレオチド部分と、分析物と関連されている試験を行なうそして同定する遺伝連鎖のためのいくつかの遺伝子プローブのいかなるものと結合するために用いられ得るDNA上の制限位置または分割位置を担持するDNAである架橋システムからなる第1物入れ手段を含む。この望ましいキットにおける他の物入れ手段は第1物入れ手段中に存在する該DNA中に存在するポリヌクレオチド部分に対する補体となるポリヌクレオチド部分と、前記システムのうちのいずれかである信号発信部分とを担持する信号発信体からなるであろう。この望ましいキットにおける第3物入れ手段または一連の物入れ手段は例えばウィルス、バクテリア、細胞等の一つまたはそれ以上のポリヌクレオチド含有分析物上に存在する遺伝連鎖の補体となるDNAプローブの種々なるものからなる。

かくして使用者は第1入れ物中のDNAを開き、第3物入れまたは一連の物入れの中に存在するいずれかの所望のDNAプローブをそれに取り入れ、ポリマーを結集しそしてその後分析物中に存在するいかなる所望の遺伝連鎖の存在をも検出し同定するために該架橋体および信号発信体を利用するための分割方法（例えば制限エンドヌクレアーゼの使用）を利用するであろう。単一らせんは連結剤（該位置にかゝる）がそれに最初ハイブリッド化され、それによってその位置において二重らせんが作成されることなくして制限酵素によって切断されることは出来ない。正常には遺伝子は微生物中で増殖され得るようにRF（二重らせん形状をなす）の中へ結集されるであろう。

今一般的に本発明を述べたが、同じことが実証のためにのみここに含まれ限定する意図は全くない、もしそうでない場合は明細に述べられるであろうある特別な実施例に対する参考資料によって実証されるであろう。

#### 実施例

実施例1〜31は架橋および信号発信部分の調製の手順に関するものである。該実施例は下記のカテゴリーに組分けされるであろう調製方法を示す。

- 1) 後続の蛋白質、サッカライドおよび低分子との対になる結合のためのオリゴヌクレオチドの化学活性化。
- 2) 後続のDNA、サッカライドおよび低分子との対になる結合のための蛋白質の化学活性化。
- 3) 後続のDNA、蛋白質および低分子との対になる結合のためのサッカライドの化学活性化。
- 4) 後続のDNAと蛋白質との対になる結合のための低分子の化学活性化。
- 5) DNAの蛋白質、サッカライドおよび低分子との対に



なる結合。

上記カテゴリーに組分けされる実施例は下記の通りである。

1) オリゴヌクレオチドの化学活性

A. 末端リボヌクレオチドラベル付けとそれに続く過ヨウ素酸的酸化および還元アミノ化による。実施例11, 12。

B. 非固有プロム化による：実施例28, 29, 30。

C. 5-ヨウドシトシンを介するシトシン部分の固有活性化による：実施例16, 17, 18。

D. 3, 4, 5-トリクロロジアゾベンゼンとの反応を介するグアノシン部分の固有活性化による：実施例1。

E. 2, 3-ジブロモプロパナールとの反応を介するアデノシンおよびグアノシン部分の固有活性化による：実施例9。

2) 蛋白質の化学活性化

A. ブロモアセチル化による：実施例13, 14。

3) サッカライドの活性化

A. 還元サッカライドの活性化による：実施例4, 5, 6。

B. 非還元サッカライドの活性化による：実施例7, 8。

4) 低分子の活性化

A. ビオチン：実施例2, 33, 23, 24, 25, 26。

B. DCTA：実施例3。

5) DNAと蛋白質、サッカライド、および低分子との対になる結合

A. 蛋白質への：実施例15, 19, 20。

B. サッカライド：実施例19, 18。

C. 低分子への：実施例19, 10, 21, 27。

実施例1

DNAの3, 4, 5-トリクロロアニリンによる活性化。

100mgの3, 4, 5-トリクロロアニリンは50% DMSO中の2.5mlの0.5M HCl中に溶解されそして氷上で冷却され、激しい攪拌下で冷1M溶液からのNaNO<sub>2</sub>の等モル量が出来ただけ迅速に添加せられ、そしてその後攪拌は10分間継続された。300  $\mu$  l の水中3Mまたは[d DNAの1mgが2Mカコジル酸塩バッファーpH6.6の300  $\mu$  l と500  $\mu$  l DMSOにより混合せられた。(DMSOの添加により溶液のpHは8.3に上昇する)。20  $\mu$  l の新たに調製されたジアゾニウム溶液がそれに添加されそして該混合物は室温で2時間解置された。解置の間に現れる若干の沈澱は遠心分離で除去された。該溶液はその後酢酸アンモニウムで0.4Mにされそして該DNAはエタノールで沈澱された。

実施例1a

トリクロロアニリン-活性化DNAのチオールとの反応、DCTA-SIIとチオール活性マンノースとの反応の例

3, 4, 5-トリクロロアニリンによって活性化されたFd DNA (実施例1) は0.1Mカセイソーダと等量の0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>中で溶解された。この溶液は0.1M DCTA-SII (実施例3) またはチオール活性化マンノース (実施例6 および9) の等量で処理され、そしてアルゴン雰囲気下で2時間65℃で解置された。沈澱されたジサルフィドが遠心分離

によって除去されそして該DNAはG50クロマトグラフィーによって精製されそして-20℃で貯蔵された。誘導体化されたDNAを平均にするために放射性Niを用いて、60%のグアニンがラベルされていたことを測定した。

実施例2

ビオチン-SII

ビオチン-NHSエステルの3ミリモルは無水DMFの25ml中に溶解されそして0.5M重炭酸ソーダの12ml中のシステアミンハイドロクロライドの1M溶液に混合され、そして該混合液は室温で一晩解置された。解置の間に重い沈澱が生じた。該液体は45℃、減圧下で除去されそして残基は50ml アブソリュートエタノール中に懸濁され、1gのNaBH<sub>4</sub>が添加されそして該懸濁液は75℃1時間攪拌された。エタノールは除去されそして冷1M HClが添加されてpH4.5に調節せられ、そして水は35℃、減圧下で除去された。(これら操作のすべてはチオールの酸化を防止するためにアルゴン雰囲気下で行なわれた。固体残基は4mlの凍脱気された0.01M酢酸の4mlを加えて粉末化されそして粉砕された。これらの手順は二回繰返されそして残基は凍結乾燥された。TLCクロマトグラフ検定は主ビオチンスポットはチオールを含み、二つの小スポットはチオール陰性であることを示した。すべての反応において、ビオチンの量はチオール含有量にもとづいた。

実施例3

DCTA-SII

DCTA-ブロマイドの1ミリモルが2, 3-ジチオエチレンの0.2mlをトリエチルアミンの0.5mlを含む50% DMFの5mlに添加された。該混合物はアルゴン雰囲気下に2時間、60~70℃で解置された。該溶液はそれから20mlの水と混合され、9mlベッドボリュームのDowex AG-1カラム上に負荷された。該カラムは流通液中にチオールがなくなるまで50mlの0.1M酢酸溶液で洗滌された。DCTA-SIIはその後0.25M HClで流出された。チオール含有フラクションは合一せられ、蒸発せられて40℃減圧下で乾燥されそして遊離酸(300mg)はアルゴン雰囲気下で-20℃で貯蔵された。

実施例4

1-O-メチル-6-O-トシル- $\alpha$ -D-マンノピラノシド

非還元サッカライドはトシレートを形成すること、そしてそれをアンモニアで置換してアミノ基を形成するかまたはジオールで置換してチオール基を形成することによって第1級アルコール類を介して活性化せられた。この実施例では、 $\alpha$ -メチル-d-マンノシド、非還元蔗糖およびマンノースが還元糖として記載される。該トシル化は刊行物に記載された手順と類似の方法で行われた(F. Cramer等, Chem. Ber. 92, 384~391 (1979))。

23gのメチル-D-マンノシドが400mlのアブソリュートピリジン中に溶解せられ、そして該溶液は氷-塩混合物上で-15℃に冷却せられた。80ml アブソリュートピリ

27

ジン中24.6gのp-トルエンスルホンクロライドの溶液が激しく攪拌されている混合液中に添加されそして-15℃、30分間そして20℃12時間反応せしめられた。ピリジンは40℃、減圧下に除去されそして残基はクロロホルム中に溶解された。該溶液は50℃に加温されそして0.5M硫酸水素カリウムで連続的に洗滌せられその後50℃で0.5M重碳酸カリウム溶液で洗滌された（ゲル形成を防止するために50℃代の温度が必要である）。

## 実施例5

6-アミノ- $\alpha$ -メチル-D-マンノシドハイドロクロ  
ライド

130mlのアブソリュートメタノール中の6gのトシレート（実施例4）の溶液は1℃で乾燥アンモニアによって飽和され、そして16時間、120℃のオートクレーブ処理された。暗所反応生成物は木炭と共に還流されそしてメタノールは蒸溜によって除去され若干黄色いシロップが残った。該シロップは水に溶解されそして置換反応がアニオン交換体を通して溶液を通過することによって除去されている間スルホン酸塩が遊離される。HClが流出液に添加せられてpH5.0に調節され、そして水が減圧下40℃で除去される。残基はアブソリュートメタノールの15mlとアブソリュートエタノールの15mlの混合液とともに粉砕されそして該固体物質は50mlのアブソリュートメタノール中に溶解されそして冷却され、25mlアブソリュートエーテルの添加は結晶化を惹起し、2.5gハイドロクロライドを得た。

## 実施例6

S-(2-メルカプトエチル)-6-チオ- $\alpha$ -D-メ  
チルマンノピラノシド

6gの糖トシレート（実施例4）は20mlの新らしく調製されたソジウムメトキシサイドの溶液を含む250mlのアブソリュートメタノール中に溶解された。該混合液に対して、5mlの1,2エタンジオールが添加された。該混合液は120℃10時間のオートクレーブ処理され、反応生成物は上記のようにして処理された。収量は3.1gであった。

## 実施例7

2,3,4,6,テトラアセチル- $\alpha$ -D-マンノピラノシルク  
ロライド

この化合物は刊行物に記載されたと類似な方法で調製された。（D.Horton, Organic Synthesis Vol 46, p.1, Wiley N.Y.1966）。

25gの乾燥マンノースは60mlのアセチルクロライドに攪拌しつつゆっくり添加された。容器には還流コンデンサーが接続されそして該混合液は室温で16時間攪拌される。クロロホルム、300ml、がコンデンサーを通して添加されそして該混合液は激しく攪拌しつつ300gの水と100mlの水の上へ注がれた。該混合物は別なロートにうつされ、そして有機物相は出来るだけ迅速に水と300mlの飽和重碳酸ソーダ溶液を含むビーカーの中へ注がれた。該有機物相は分離されそして無水硫酸マグネシウムの25

28

gによって乾燥された。乾燥剤は除去され乾燥アルコールフリークロロホルムで洗滌されそして該結合クロロホルム溶液はロータリーエバポレーター中で減圧下35mlに濃縮された。50℃でエーテルが若干濁るまで該溶液に添加され、該溶液は室温に放置された。結晶はろ過によって除去されそして乾燥エーテルで洗滌された。収量は39gであった。

## 実施例8

S-(2-メルカプトエチル)-1- $\beta$ -D-マンノピ  
ラノシルスルファイドおよびS-(2-アミノエチル)-  
1- $\beta$ -D-マンノピラノシルスルファイド

60ml無水DMF中に10gアセトクロロマンノース（実施例7）の溶液に4mlの1,2エタンジオールまたは5gシステアミンハイドロクロライドおよび5gの粉末化炭酸ソーダがアルゴン雰囲気下、6時間、70℃で攪拌されている該懸濁液に添加された。該炭酸塩は除去されそして該液体は減圧下45℃で蒸発された。該残基はアブソリュートメタノール中に溶解されそして新らしく調節された0.1MソジウムメトキシサイドがpHを8.0に調節するために添加されそして該混合液は室温で5時間攪拌された。2mlの水酢酸が添加せられそして該溶液は減圧下に除去された。該残基は酢酸から再結晶された。収量は3.1gであった。

## 実施例9

1,2ジブロモプロパナールによるDNAの活性化

エーテル中のアクロレイン（1.7g）の溶液が氷浴上で冷却されそして1.3mlのプロムが次のプロム添加までに色が消えるのを待ちながら攪拌下にゆっくり添加された。エーテルが溶液にアルゴンを吹き込むことによって部分的に除去された。以下の操作に用いられるDNAはDMFへの溶解を容易にするためにトリエチルアンモニウム型にした。

250 $\mu$ lの水中の0.5mgの3H fd-DNA（線状）（部分的にトリチウム化される）が3.0mlの70%エタノール中0.5Mトリエチルアンモニウムアセテート、pH4.5と共に混合せられそして50 $\mu$ lのジブロモプロパナール溶液が添加された。該混合液は暗所で37℃、40時間攪拌された。反応は蛍光の発現によって監視された。該反応混合液は減圧下に蒸発されて乾燥され、そして該DNAは0.6ml水に溶解されそしてG50濾過によって流出液として水を用いて脱塩された。放射能を含むフラクションは合一せられそして該容量は0.2mlに減少された。

## 実施例10

3,4,5-トリクロロアニリンDNAのDCTA-SHによるラベル

0.2mlの水中0.5mgの該活性化されたDNA（実施例1）が90%DMF中2.0mlの0.5Mトリエチルアンモニウムアセテイトと混合されそしてトリエチルアンモニウム型のDCTA-SHの50mgが添加された。該混合液は暗所で4時間、50℃で攪拌された。該DMFは減圧下、45℃で除去されそして該DNAはG-50濾過によって脱塩された。ラベルの程度はその後放射性Ni63の使用によって測定された。計算に

よれば平均して5.3塩基ごとにラベルされていた。

同様な手順がこれら物質（実施例2,6および8）のチオ誘導体を用いて該活性化DNAのビオチン化およびグリコシル化のために用いられた。

#### DNAの化学的ラベル

##### 原理

あるジアソニウム塩とグアノシンの対になる結合は8位置では安定な着色生成物を与え（H. Fischer, Z. Physiol. Chem., 60, 696~78 (1909)）、そして2位置では酸変性されやすい黄色生成物を形成する（H. Kossel, Z. Physiol. Chem. 340, 210, 1965, E. N. Moudrianakis等, Biochim. Biophys. Acta 123, 421 (1966)）。単一らせん形状の核酸中のグアノシン残基はジアソニウム塩と結合出来そしてこの反応は単一らせん形状の核酸をセルロースに固定するために用いられて来た（J. C. Alwine等, Methods in Enzymology, Vol. 68, p. 220~242, 1979）。もし該結合されたジアソニウム化合物がチオールまたはアミンによって容易に置換されることが出来る活性基を含んでいるならば、これはビオチンまたは他の基を単一らせん形状の核酸に結合するための容易な方法を構成する。3,4,5-トリクロロフェニルジアソニウムクロライドは本発明者等によってビオチン、1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N,N,N-テトラ酢酸（DCTA）およびある種の糖を単一らせん形状のDNAに添加するために用いられて来た物質である。

単一らせん形状の核酸をラベルするための他の可能性はクロロアセチルアルデヒドはpH4.5でアデニンと反応して蛍光ビニル誘導体を形成し（穏やかな条件下）、J. R. Barrio等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 597~604, 1972）、シチジンはpH3.5で反応しそしてグアニンはpH6.5で反応する。pH4.5ではグアニンは全く反応しない（P. D. Sattisangi等, J. Org. Chem., 42, 3292~3296, (1977)）。

クロロアセチルアルデヒドの代りに1,2ジブロモプロパナールを用いることによって、活性第1級ブロム化物と共に穏やかな反応条件下で、チオールまたはアミン誘導体と反応するDNAを誘導化することが可能であり、DNAをラベルする他の方法を提供する。これら二つの方法は塩基固有性である。

##### 実施例11

5'-ウリジンモノホスフェイト（UMP）の末端トランスフェラーゼおよび5'-ウリジントリホスフェイトによる線状3H fd-DNAに対する末端付加

解置混合液の600  $\mu$  l は400  $\mu$  g のDNA, 1mM CoCl<sub>2</sub>, 0.2mMジチオスレイトール, 0.1Mカコジル酸, 25mmolトリス塩基, 1mM UTPおよび400単位の末端トランスフェラーゼを含む。該混合物の最終pHは6.9~7.0であった。

該混合液は2時間、35℃で解置された。該DNAはエタノールで沈澱されそして400  $\mu$  l の0.2M酢酸ソーダpH4.7に溶解された。

##### 実施例12

末端リボ基の酸化と還元アミノ化。アミノカルボキシおよびチオ-末端置換DNAの合成

解置混合液の450  $\mu$  l は、400  $\mu$  g の末端ラベル化されたDNA（実施例11）、0.2M酢酸ソーダpH4.7および0.1M NaIO<sub>3</sub>を含む。それは暗所で室温で2時間解置されそして該混合液は0.3Mホウ酸カリウムpH9.0~9.3中で平衡化されたG 50カラムに通されて0.2mlのフラクションが集められた。すべての放射性フラクションは総量1.2mlに合一せられた。該DNA溶液はアミノ成分の1つ（ $\epsilon$ -アミノカプロン酸、システアミン、または1,6-ジアミノヘキサン、pH9.3に調節された1Mのストック溶液を用いる）によって0.4Mにされた。

得られた Schiff 塩基は下記のようにNaBH<sub>4</sub>で還元された。水（1ml）中1:0.2Mに新らしく溶解されたNaBH<sub>4</sub>は30分間隔で4つの部分に添加された。該解置は計3時間続けられた。塩と過剰のアミノ成分は1mMペーターメルカプトエタノールを含む0.4M酢酸ソーダ中で平衡化されたカラム中のG 50濾過によって除去され、該DNA含有フラクションはその後合一せられ-70℃でアルゴン雰囲気下に貯蔵された。使用前にDNAはエタノールで沈澱されそして所望のバッファーに溶解された。

##### 実施例13

プロモ酢酸N-ハイドロキシサクシニミドエステルの活性化

プロモ酢酸のNHS（N-ハイドロキシサクシニミド）エステルは下記の通りに調製された。プロモ酢酸の100ミリモル（13.9g）は50mlの無水DMF中に溶解され、この溶液に対して100ミリモル（20.6g）のN-Nジシクロヘキシルカルボジイミドが攪拌しつつ添加せられ、次いで100ミリモルのN-ハイドロキシサクシニミド（100%純度として11.9gに調節された）が添加せられ、そして該混合液は6時間37℃で攪拌された。該混合液はその後ハイドロキシ尿素の沈降を促進するために-20℃で2時間放置され、該沈澱は濾過によって除去された。該濾過物において、DMFは減圧下45℃で除去されそして活性化エステルは2-プロパナールから再結晶された。

##### 実施例14

IgGのプロモアセチル化

0.3molホウ酸バッファーpH9.9中のIgG（20mg/ml）がDMF中のプロモ酢酸（実施例13）のNHSエステルの10mg/ml溶液の0.06容量と混合された。該試料はその後0.1M NaCl 0.1mol磷酸塩バッファーpH7.5に対して透析された。

##### 実施例15

DNA-IgG結合体の合成

0.3Mホウ酸カリウムバッファー中のプロモアセチル化IgG（実施例14）の1.6mg/mlは室温でアルゴン雰囲気下でチオ-置換された末端ラベルされたDNA溶液（実施例12）の3mg/mlと共に2時間解置された。メルカプトエタノール0.01Mがその後添加されそして該混合物は更に同

31

温度で2時間静置され未反応ブロム残基を除去された。該溶液はその後蛋白質Aカラム上で吸着されそして未結合DNAは1.0M NaClによって流出された。該DNA-IgG結合体と該未反応IgGはイソチオシアナートによって流出されそして0.1Mリン酸塩バッファー、pH7に対して透析されてイソチオシアナートを除去された。該結合IgGと遊離IgGは硫酸アンモニア50%でその後沈澱され、ペレットは1.0Mリン酸塩バッファー中に溶解されそして遊離IgGは結合IgGから0.01M NaCl、0.1Mリン酸塩pH7.2の中で平衡されたBio-Gel p-300カラム上で分別することによって分離された。

#### 実施例16

##### BR 322の水銀化

水銀酢酸 (3mg, 0.01ミリモル) を含む5mM酢酸ソーダpH7.5の1ml中に溶解されたBR 322 DNA (100 $\mu$ g) はDale等の方法 (Nucl. Acid Res. 2:915, 1975) によって50℃4時間反応された。5-シトシン水銀化DNAは完全に0.02M食塩2mMEDTAを含む0.01MトリスHCl中で透析された。

#### 実施例17

##### 水銀化BR 322 DNAのヨウ素化

1ml 0.1MトリスHCl pH7.5の中の前実施例からの水銀化DNAへDale等の方法 (Nucl. Acid Res. 2:915, 1975) を用いて1mgのヨウ素が添加された。20℃2時間の反応の後過剰I<sub>2</sub>はクロロホルムで抽出されそしてヨウ素化されたDNAは0.02M食塩と2mMEDTAを含む0.01MトリスHClに対して透析された。置換されたDNAはN. クラッサエンドスクレアーゼ、蛇毒ホスホジエステラーゼDNAラーゼそしてE. coliアルカリホスファターゼによる連続分解により分析された (H. Yamasaki等Cancer Res. 37:1389, 1977)。該混合液はDE-52アミノセルロースを介して流出され、そしてヌクレオチドは標準としてオーセンティック5-ヨウド-2'-デオキシウリジンをを用いて逆相HPLCによって分析された。

#### 実施例18

##### 5-ヨウドシトシン、BR 322 DNAのアミンとの反応。1,6-ジアミノヘキサンとの反応の実施例

1ml 0.1Mホウ酸ソーダ中に透析された前反応からのヨウド化DNAに116mg (1ミリモル) ジアミノヘキサンが添加された。該反応混合液はアルゴンで曝気せられそして100℃2時間加熱された。該アミノヘキシル置換DNAは完全に0.01MトリスHCl pH7.5の中へ透析された。

アミノカブロン酸、ビス (2-アミノエタン) ジスルファイドおよび6-アミノ- $\alpha$ -メチル-D-マンノ (実施例5) に対する反応条件は本質的に同一である。

#### 実施例19

1-エチル-3-ジイソプロピル-アミノカルボジミド (EDAC) を用いたアミノおよびカルボキシー置換核酸の蛋白質またはアミンへの対になる結合

1ml 0.01M NaCl pH7.5 (HCl) 中に溶解されているアミノ-または-カルボキシー末端置換DNA (実施例11) (5

32

0 $\mu$ g) と3H-ラベルストレプトアビジン (50 $\mu$ g) に対して5mgEDACが添加された。該反応物は暗所で20時間静置されそしてDNAは4M CaCl<sub>2</sub> (0.03ml) の添加によって沈澱せしめられた。DNAは1ml水中に再溶解されそしてこの手順は未結合蛋白質を除去するために2回以上繰返えされた。該蛋白質-結合DNAはイミノビオチン-セファローズ親和性カラム (K. Hoffman等, PNAS 77:4666, 1980) 中で親和性精製された。

#### 実施例20

カルボキシヘキシル-置換DNAのN-ハイドロキシサクシンイミド活性化および蛋白質またはアミンとの結合、ストレプトアビジン結合

##### DNAの実施例

カルボキシ末端置換DNA (実施例19) (50 $\mu$ g) はDow ex 50-WX (E<sub>13</sub>N+) と共に水溶液を振盪することによってトリエチルアンモニウム塩に変換された。該溶液は凍結乾燥されそして該乾燥されたDNAはジクロヘキシルカルボジイミド (10.3mg, 0.05モル) とN-ハイドロキシサクシンイミド (5.8mg, 0.05モル) が添加されている無水ジメチルホルムアミド (0.5ml) 中に溶解された。室温で20時間の静置の後、該反応物は遠心分離されそして上澄は2時間10mM NaCl中へ透析された。0.2Mホウ酸塩、pH8.5 (1ml) 中に溶解されているストレプトアビジン (50 $\mu$ g) はN-ハイドロキシサクシンイミド活性化DNAに添加されそして該反応物は20時間静置されそして0.01M NaClの中へ透析された。該ストレプトアビジン結合DNAはCaCl<sub>2</sub>沈澱および前記されたと同様にイミノビオチン親和性クロマトグラフによって精製された。

#### 実施例21

DNAのグリオキザールとの反応

DNA (1 $\mu$ g) (プラスミド、DK14からのBAM挿入) は0.025Mグリオキザール (0.2ml) 中に溶解されそして100℃30分密閉試験管中で加熱された。該反応物は10mM NaClに対して透析された。グアノシン上の反応の程度を評価するために、反応物の一部分はHClでpHを1.0に低下させそして100℃で30分加熱することによって酸デブリネーションを受ける。該デブリネーションされたDNAはDE-52アミノセルロースを通しての流出によって除去されそして流出されたブリンは逆相HPLCによって分析された。アデノシン、グアノシンおよびグリオキザール-グアノシンアダクトのピーク高さの比較 (R. Shapiro等, Biochem. 5:2799, 1966) は70%のグアノシンが置換されたことを示した。

#### 実施例22

##### N-ビオチニル-4-アミノアセトフェノン

20mlジメチルホルムアミド (DMF) 中に溶解されたビオチン-N-ハイドロキシサクシンイミドエステル (50 $\mu$ g, 0.014ミリモル) の溶液に50ml DMFと100ml 0.1Mホウ酸塩バッファーpH8.5中に溶解された4-アミノフェニルアセトフェノン (4.35g, 0.03モル) が添加された。室

温で20時間の反応の後、該溶媒はロータリーエバポレーターで蒸発されることによって除去された。残基油状物質は先づ0.1N HClですり碎かれその後5%重炭酸ソーダですり碎かれる。生成物はエタノールから結晶化せしめられる。

#### 実施例23

##### ビオチニル(4-アミノフェニル)グリオキザール

セレンウムジオキサイド(0.75g, 7ミリモル)が0.15ml水を含む4mlジオキサン中に溶解された。これへ5mlジオキサン中に溶解されたN-ビオチニル-4-アミノアセトフェノン(1.9g, 7ミリモル)の溶液が滴加された。該反応物は3.5時間還流されその後該混合液は濾過されそして真空下で濃縮された。粗生成物はシリカゲルクロマトグラフによって精製された。

#### 実施例24

##### 1, N-ビオチニル-1, 6-ヘキサンジアミン

ジメチルホルムアミド(5μm)中に溶解されているビオチン-N-ヒドロキシサクシンイミドエステル(1.0g, 2.9ミリモル)が0.1Mホウ酸ソーダ(500ml)中ジアミノヘキサン(1.15g, 10ミリモル)の溶液に添加された。室温で5時間反応の後、該溶液はロータリーエバポレーターによって蒸発され、10ml水中に再溶解されそしてDowex 50-WX(H+)上でクロマトグラフにかけられた。カラムは50%メタノール水溶液で洗滌されそして50%メタノール水溶液(0.3M)中に溶解しているトリエチルアミンを有する流出フラクションが集められた。蒸発残基はエーテルで完全にすり碎かれそしてDMF/エーテルから再結晶させられた。

#### 実施例25

##### CH<sub>3</sub>-CO-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-ビオチン

20ml無水DMF中ビルビン酸(0.44g, 5ミリモル)の4℃に冷却した溶液へイソブチルクロロホルム化(0.64g, 5ミリモル)およびトリ-N-ブチルアミン(1.43g, 1.5ミリモル)が添加された。この温度で20分後、更に1.4gトリ-N-ブチルアミンが添加されそして該混合液は30ml DMFと30ml 0.1Mホウ酸ソーダ中に溶解された1, N-ビオチニル-1, 6-ヘキサンジアミン(実施例24)の溶液に添加された。4℃1時間の反応の後、該混合液は更に20時間室温で放置せられそして続いて真空中で濃縮された。該混合液はシリカゲル上クロマトグラフによって精製されそして生成物はエタノールから再結晶された。

#### 実施例26

##### CH<sub>3</sub>-CO-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-ビオチン

セレンウムジオキサイド(54mg, 0.5ミリモル)が25μl水を含むジオキサン(0.5ml)中に溶解された。1mlジオキサン中に溶解されたCH<sub>3</sub>-CO-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-ビオチン(実施例25)(0.21g, 0.5ミリモル)が滴加されそして該反応物は100℃4時間加熱された。得られた沈澱は遠心分離によって取除かれジオキサンで洗滌せられそして上澄は真空で濃縮された。該粗混合物はシリカゲル

ル上でクロマトグラフにかけられた。

#### 実施例27

##### DNAのビオチン化グリオキザール誘導体との反応

トリエチルアンモニウム塩としてのDNA(1μg)が100μl水に溶解された。これに対してジメチルホルムアミド中(N-ビオチニル(4-アミノフェニル)グリオキザール(0.05M)またはCH<sub>3</sub>-CO-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-ビオチン(0.05M)の溶液の100μlが添加された。該混合液は密閉された試験管中100℃30分加熱されそして続いて0.01M NaClに対して透析された。反応物の大きさは前に述べたプリンスクレオシドの酸デプリフィケーションとHPLC検定で検出された。

#### 実施例28

##### BR 322 DNAのプロム化

0.5M酢酸塩バッファーpH5.5中に溶解されたBR 322 DNA(100μg)の溶液に対してプロム(5.5μl, 0.1ミリモル)が添加された。該反応物は60℃30時間静置されそして0.01M NaClに対して完全に透析された。

#### 実施例29

##### プロム化BR 322 DNAのチオールとの反応。システアミンと3-メルカプトプロピオン酸との反応の実施例

0.1Mホウ酸塩pH8.5(1ml)中プロム化BR DNA(500μg)の溶液がシステアミンまたは3-メルカプトプロピオン酸(20mg)のいずれかとアルゴン雰囲気下室温で20時間静置された。得られたアミン-またはオルボキシ-置換DNAは0.01M NaClに対して透析された。

#### 実施例30

##### プロム化BR 322 DNAのアミンとの反応。1, 6-ジアミノヘキサンとの反応の実施例

30 プロム化BR 322 DNA(100μg)と1Mの1, 6-ジアミノヘキサン(1ml)の溶液はアルゴン雰囲気下で65℃3時間加熱された。得られたアミン置換DNAは0.01M NaClに対して透析された。

#### 実施例31

##### 信号発信ポリヌクレオチドに結合された蛋白質の合成。化学的に放射性ラベルされたDNAに結合されたIgGの実施例

40 Fd DNAは実施例11において述べられた条件下で末端トランスフェラーゼを用いてUMPで末端ラベルされた。該末端ラベルされたDNAは2, 4, 5-トリクロロアニリン(実施例1)で誘導化されそして実施例1aに述べられたと同一な条件下でDCTA-SIIと反応させられた。該末端ラベルされたDCTA誘導体化されたDNAは過ヨウ素酸ソーダによって酸化され、システアミンと反応されそして実施例12で述べたようにソジウムボロハイドライドで還元された。これは順番に実施例15において述べた条件を用いてボロアセチル化IgG(実施例14)と反応せられた。

#### 実施例32

##### 架橋体としてのバクテリオファージM13の使用

50 組み換えDNA技術の手法を用いて、非対称DNA連鎖はM1

3のような単一らせん形状のファージの複製（二重らせん形状）の中へ挿入されることが出来る。挿入物の一つのらせんはグアニン残基中に欠けているだろう。本発明の一つの結果として、二つの単一らせん形状のファージは二つの極性、一つは（G-）らせん、即ち非対称連鎖にグアニル酸残基を有していない、他はG（+）連鎖と呼ばれるべきG（+）連鎖と補体をなす連鎖を含んでいる、で得られるであろう。該G（+）ファージは例えばヘルペス単純ウィルスI DNA連鎖のような関心のあるDNAプローブを担持するためのベクトル（架橋体）として用いられる。

該G（-）ファージ（信号発信体）は例えば1,2-ジカルボニル試薬のようなグアノシン固有試薬と化学的に反応せられる。該G（-）ファージ中の該G（-）挿入物はグアニル酸残基を欠くので変性されない。

単一らせん形状のM13の調製のための一般的手順は次の通りである。

1. M13 mp8 rf（複製型、二重らせん形状）が培養せられる。それは短太な末端を残したHinc IIで切断される。
2. pd（G-T）<sub>s</sub>とpd（A-C）<sub>s</sub>が与えられそしてハイブリッド化されて完全な二重らせんを形成する。該末端は完全に対になって結合されるべきである。この条件を得るためにハイブリッド化のために高Ca<sup>++</sup>条件を用いることが必要である。
3. ハイブリッドは制限酵素Rsa Iの存在下で結集される。Rsa Iは連鎖GTACを認識しそしてそれ故に切断して短太な末端を残しそして結集を修正するであろう。
4. 該結集生成物は単離される。これらは二重らせん形状のポリd（G-T）ポリd（A-C）である（いかなる補体、繰返し、低複雑性連鎖をも使用出来る。該連鎖変性および化学的性質はしたがって調節せられるべきである。）
5. アルカリホスファターゼは5'ホスフェイトの除去に用いられる。
6. ポリヌクレオチドキナーゼと<sup>32</sup>P-ATPは<sup>32</sup>P-ホスフェイトで5'末端を置き換えるために用いられる。
7. 該反応混合物は15~20%非変性ポリアクリルアミドゲルに展開せられて異なったサイズの断片を分離する。
8. 該断片は放射線写真測定によってゲル上の位置を検出される。
9. 所望のサイズのバンドはゲルを切断すること、該ゲルを潰しそれから高塩バッファーで抽出することによってゲルから流出される。
10. DNAは例えばエタノール沈澱、スベルミン沈澱、凍結乾燥等の多くの可能な手法のいずれかによって濃縮される。
11. 該断片はHinc IIで切断M13の中へクローン化されるべく用意される。

標準スタンダード手法を用いて、次の手順が行われる。

- a. 断片はM13の中へ結集される。
- b. 細胞（例えばE.coli JM103）はM13で変転される。
- c. 変転細胞は被覆せられる、そして
- d. 組み換え体を選択される。

12. 組み換え体の選択のためには二つの可能なルートがある。

a. もし、既知の寸法の組が挿入されたならば、真点は選ばれそして挿入物の存在をチェックするため順序付けされる。

b. 改変方法はステップ4で作成された連鎖のすべてをM13の中へ狙い打ちすることである。この手順はより多くのクローンが選ばれそして順序付けによってチェックされることを要求する。

13. 一たん適当なクローンが得られたならば（適当な寸法の連鎖を有するM13）、単一らせん複製形状の中へGTGT等を与えるらせんは選択されるであろう。このクローンはその後複製形状の中へ種々の病原菌からの連鎖を挿入することによって更に進んで遺伝子工学のために用いられる。

14. 複製形状中のACAC等を与えるらせんはマス培養中でクローン化され、G'sに固定な報告体（信号発信部分）によって変性される。かくしてG（-）ファージは二官能性試薬p-アジドフェニルグリオキザール（APG）と完全に反応せられる。APGのジカルボニル部分は只DNAの単一らせん形状部分におけるグアノシン残基とのみ反応する。グアノシンを欠く挿入物はこの処理によって影響されない。

15. G（+）そして誘導体化された（G-）DNAは当モル濃度で混合せられそしてターゲットDNAおよび相互にハイブリッド化せしめられる。ハイブリッドの視覚化は標準信号報告手法による。

本発明に関しては既に十分に述べたけれども、ここに述べられた本発明もしくは実施例のいずれの精神又は範囲にも影響することなく、同様の構成や過程を生ずる広範囲に亘る改変の対象となりうる通常の技術によって理解される。

#### 【図面の簡単な説明】

本発明は添付図面と参照することによってより良く理解されるであろう。

第1図は本発明の検定システムに対する一般化図式を表わす。分子的に認識可能な部分2を有する分析物1には分析物1上の分子的認識可能部分2を認識することが出来る部分4を有する分子架橋体3との接触がもたらされる。加うるに架橋体3は一般にATCGATC...として記されるポリヌクレオチド連鎖からなる部分5を担持する。またシステムにおける存在は架橋体3のポリヌクレオチド部分5にアニーリングし得るポリヌクレオチド部分7を有する信号発信体6である。信号発信体6はまた信号発信部分8を担持する。分析物が分析される試料中に存在する時、認識可能および認識部分2と4を夫々介して

37

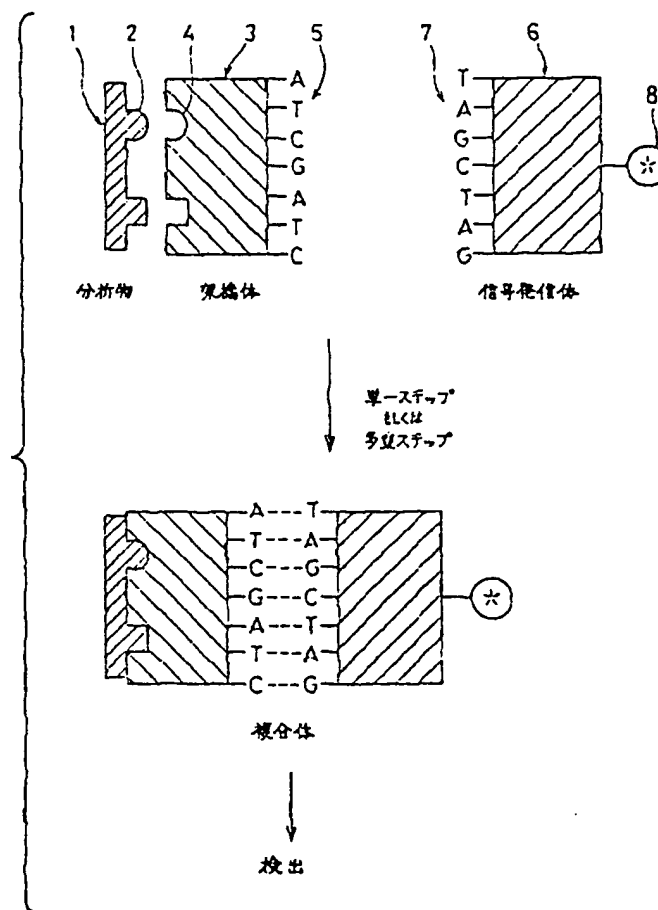
架橋体 3 との相互作用が起る。それによって形成される複合体はそれからポリヌクレオチド部分 5 を介して分析物 1 とのある化学量論的關係の中へ信号発信部分 8 を持つて来る信号発信体上の補体ポリヌクレオチド部分 7 に対してアニーリングされる。

第 2 図は分析物 9 が DNA 連鎖 10 (一般的に ATCGATCGATC として示される) からなる本発明のより広い概念の下より望ましいシステムを示す。単一らせん形状の環状ポリヌクレオチドポリマーとして示される架橋体 11 は分析物の DNA 連鎖と補体をなす DNA 連鎖である認識部分 12 を担持する。加うるに架橋体 11 はまた信号発信体 14 上の補体

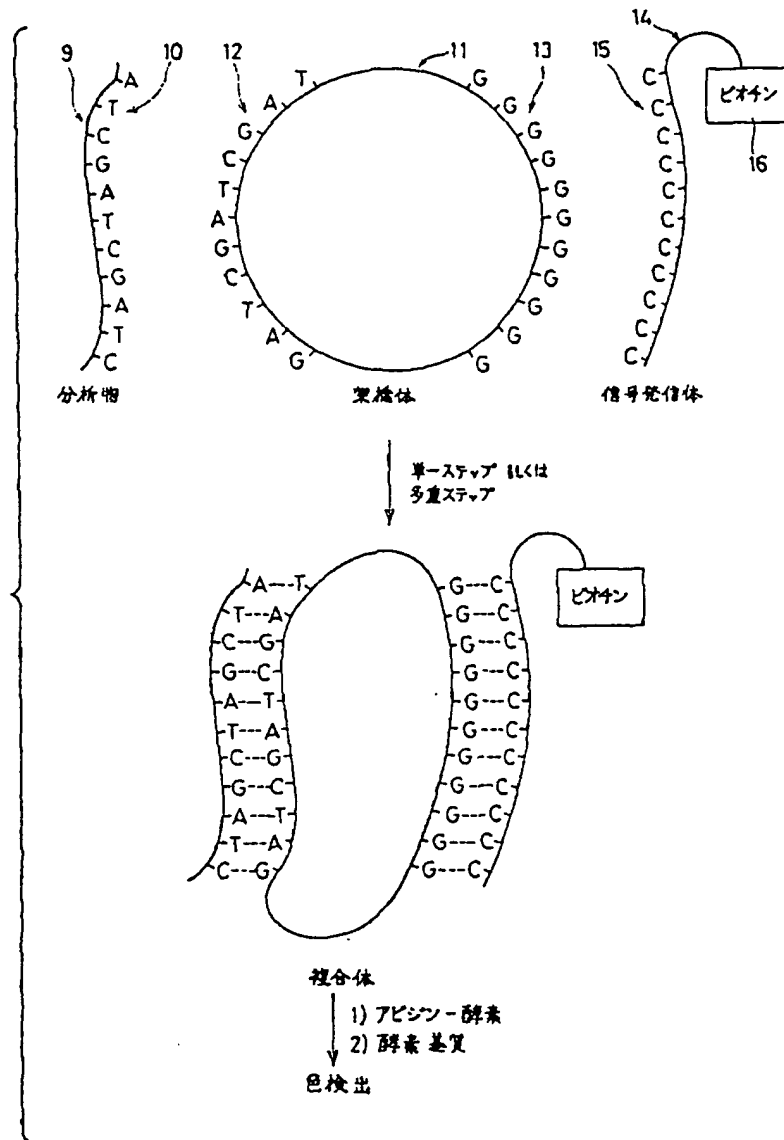
38

り C 連鎖 15 との安定なハイブリッドをアニーリングしそして形成することの出来るポリ G 連鎖 13 を担持する。信号発信体 14 はまたその信号発信基としてビオチン部分 16 を担持する。分析される試料の中の DNA 連鎖の存在は架橋体 11 へのハイブリッド化を惹起し、それに続く信号発信体のかくして形成された複合体へのアニーリングは網状形状を介してビオチン部分を分析物に結合する。該ビオチン部分 16 はその後例えばアビジン/酵素結合体の添加、次いで酵素基質の添加、そして色検出によって検出 10 されることが出来る。

【第 1 図】



【第2図】



フロントページの続き

(72)発明者 ジャニス ジー. スタブリアノボロス  
アメリカ合衆国 10019 ニューヨーク、  
ニューヨーク、ストリート 59 ウェス  
ト 515

(72)発明者 イラザール ラバーニ  
アメリカ合衆国 10003 ニューヨーク、  
ニューヨーク、フィフス アベニュー

69

(72)発明者 ディーン エル. エンゲルハート  
アメリカ合衆国 10024 ニューヨーク、  
ニューヨーク、リバーサイドドライブ173

(72)発明者 スタン クライン  
アメリカ合衆国 11217 ニューヨーク、  
ブルックリン、リンカン プレイス  
235



Japanese Patent Application No. 090041/84  
Your Ref.: Enz-11  
Our Ref.: P-59-40

*Granted*  
//  
(submitted 96/5/16)

Title: ASSAY METHOD UTILIZING POLYNUCLEOTIDE SEQUENCES

Claims:

1. A method of detecting in a sample an analyte (A) having a molecularly recognizable portion thereon, which comprises:  
providing:  
a molecular bridging entity (B) having thereon:  
(i) a first portion capable of recognizing and binding to said molecularly recognizable portion on said analyte (A); and  
(ii) one or more second portions each such portion comprising a polynucleotide sequence;  
and  
one or more signalling entities (C) each such entity having thereon:  
(i) a polynucleotide portion capable of annealing to said polynucleotide second portion of said bridging entity (B), thereby to form a stable polynucleotide hybrid; and  
(ii) one or more signal generating portions;  
forming a complex comprising :  
(1) said analyte (A) bound through said molecularly recognizable portion to  
(2) said recognizing first portion of said entity (B);  
said entity (B) being annealed through said polynucleotide second portion or portions thereon to  
(3) said polynucleotide portion or portions of said signalling entity or entities (C); and  
detecting a signal by means of said signal generating portion or portions present in said complex.
2. The method of claim 1, wherein said molecular bridging entity (B) comprises more than two second portions.
3. The method of claim 2, wherein the the number of the ratio of polynucleotide second portions to the recognizing first portion is greater than two.
4. The method of claim 3, wherein the ratio number is greater than 5.
5. The method of claim 4, wherein the ratio number is greater than 10.
6. The method of claim 1, wherein more than two signalling entities (C) are provided to form the complex.

7. The method of claim 1, wherein said signalling entity or entities (C) comprise more than two signal generating portions.
8. The method of claim 7, wherein the number of the ratio of the signal generating portions to the polynucleotide portion in the signalling entity or entities (C) is greater than two.
9. The method of claim 8, wherein the ratio number is greater than 5.
10. The method of claim 9, wherein the ratio number is greater than 10.
11. The method of claim 1, wherein said second portion in the molecular bridging entity (B) comprises more than two polynucleotide sequences, and/or more than two signalling entities (C) provided to form the complex, and/or said signalling entities (C) comprising more than two signal generating portions.
12. The method of claim 1, wherein the number of the ratio of second portions to the first portion in the molecular bridging entity (B) is greater than two, and/or the number of the ratio of signalling entities (C) to the molecular bridging entity (B) is greater than two, and/or the number of the ratio of signal generating portions to the polynucleotide portions in the signalling entities is greater than two.
13. The method of claim 12, wherein each of the number ratios are independently greater than 5.
14. The method of claim 13, wherein each of the number ratios are independently greater than 10.
15. The method of claim 1 wherein said analyte is present in a biological or non-biological sample.
16. The method of claim 1 wherein said molecularly recognizable portion on said analyte is proteinaceous.
17. The method of claim 1 wherein the molecularly recognizable portion on said analyte comprises nucleic acid.
18. The method of claim 1 wherein the molecularly recognizable portion on said analyte comprises a saccharide.
19. The method of any of claims 16, 17 or 18 wherein said analyte is selected from the group consisting of an antigen, an antibody, a receptor, a virus, a viral component, a bacterium, a bacterial

component, a cell, a cellular component, or any pathogenic or non-pathogenic component of a sample.

20. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a polynucleotide sequence.
21. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an antigen.
22. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an antibody.
23. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a saccharide.
24. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a lectin.
25. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a hormone.
26. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a receptor.
27. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an enzyme inhibitor or enzyme cofactor.
28. The method of claim 1 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an enzyme active site, a cofactor binding site, or a receptor protein.
29. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence on said bridging entity codes for a gene product or fragment thereof.
30. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence on said bridging entity does not code for a gene sequence or fragment thereof.
31. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence on said bridging entity comprises a poly deoxy G, poly deoxy C, poly deoxy T or poly deoxy A sequence, or any poly-ribo or -deoxyribo purine, pyrimidine or analog.
32. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence on said bridging entity comprises a sequence portion which is rich in guanosine residues.

33. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to another polynucleotide sequence.
34. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an antibody.
35. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an antigen.
36. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a saccharide.
37. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a lectin.
38. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a hormone.
39. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a receptor.
40. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an enzyme inhibitor or enzyme cofactor.
41. The method of claim 1 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an enzyme.
42. The method of claim 20 wherein said bridging entity is a circular DNA polymer.
43. The method of claim 42 wherein said DNA is single-stranded.
44. The method of claim 42 wherein said circular DNA polymer is derived from a filamentous phage.
45. The method of claim 44 wherein said filamentous phage is M13 or a variant thereof.
46. The method of claim 45 wherein said M13 phage carries a sequence portion which is rich in guanosine residues, or cytosine residues.
47. The method of claim 1 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity codes for a gene product or fragment thereof.

48. The method of claim 1 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity does not code for a gene product or fragment thereof.
49. The method of claim 1 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity comprises a poly deoxy C, poly deoxy G, poly deoxy A, poly deoxy T sequence, or a repeating sequence of low complexity.
50. The method of claim 1 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity comprises a sequence portion which is rich in cytosine residues, or guanosine residues.
51. The method of claim 1 wherein said signalling entity is a polynucleotide polymer.
52. The method of claim 51 wherein said signalling entity is a naturally occurring modified DNA.
53. The method of Claim 52 wherein said polynucleotide polymer is derived from a T (even) phage.
54. The method of claim 53 wherein said said T (even) phage is T<sub>4</sub>.
55. The method of claim 52 wherein said modified DNA carries a cloned insert.
56. The method of claim 51 wherein said polymer is single-stranded.
57. The method of claim 56 wherein said polymer is derived from a filamentous phage.
58. The method of claim 57 wherein said phage is M13 or a variant thereof.
59. The method of claim 1 wherein said signal generating portion of said signalling entity is radiolabeled.
60. The method of claim 1 wherein said signal generating porito of said sinalling entity is not radiolabeled.
61. The method of claim 60 wherein said signal generating portion comprises an enzyme.
62. The method of claim 60 wherein said signal generating portion comprises a biotin moiety.
63. The method of claim 60 wherein said signal generating portion comprises a fluorogenic compound.

64. The method of claim 60 wherein said signal generating portion comprises an electron dense compound.
65. The method of claim 60 wherein said signal generating portion comprises or binds to an insoluble phage.
66. The method of claim 65 wherein said insoluble phage comprises a latex particle, a resin, or a bacterium.
67. The method of claim 60 wherein said signal generation portion comprises an antibody or antigen.
68. The method of claim 60 wherein said signal generation portion comprises a saccharide or lectin.
69. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises a radioactivity measurement.
70. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises an enzymatic reaction.
71. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises a fluorescence measurement, or electron microscopic measurement.
72. The method of claim 60 wherein said signal generating portion is a polynucleotide sequence capable of recognizing a signal containing moiety.
73. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises an antibody/antigen complexation reaction.
74. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises a complexation reaction between biotin and a biotin binding moiety.
75. The method of claim 74 wherein said moiety is avidin, streptavidin or an anti-biotin antibody.
76. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises detection of an electron dense compound.

77. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises a complexation reaction between a saccharide and a lectin.
78. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises a binding step on an insoluble phase.
79. The method of claim 1 wherein said step of detecting a signal by means of said signal generating portion comprises complexation between a signalling entity comprising a cloned insert on a naturally occurring modified DNA, and the bridging moiety, followed by binding a modified lectin to said signalling entity.
80. The method of claim 79 wherein said modified DNA is derived from a T<sub>4</sub> phage.
81. The method of claim 78 wherein said insoluble phase is a latex particle.
82. The method of claim 1 wherein said recognizable portion on said analyte is a polynucleotide sequence, said recognizing portion on said bridging entity is a polynucleotide sequence capable of stably annealing thereto, said bridging entity is a single-stranded DNA polymer, and said step of detection by means of said signal generating portion on said signalling entity is based on non-radioactive detection.
83. The method of claim 72 wherein said bridging entity is derived from a filamentous phage.
84. The method of claim 72 wherein said signalling entity is derived from a filamentous phage.
85. A kit useful for the detection of an analyte (A) having a molecularly recognizable portion thereon, comprising ;
- I) a carrier being compartmentalized to receive in close confinement therein one or more container means;
  - II) a first container means containing a molecular bridging entity (B) having thereon:
    - (i) a first portion capable of recognizing and binding to said molecularly recognizable portion on said analyte (A); and
    - (ii) a second portion comprising a polynucleotide sequence; and
  - III) a second container means containing a signalling entity (C) having thereon:
    - (i) a polynucleotide portion capable of annealing to said polynucleotide second portion of said bridging entity (B),

thereby to form a stable polynucleotide hybrid; and  
(ii) a signal generating portion.

86. The kit of claim 85 which also comprises;

IV) a third container means containing components needed to detect a signal from said signal generating means.

87. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a polynucleotide sequence.

88. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an antigen.

89. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an antibody.

90. The kit for claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a saccharide.

91. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a lectin.

92. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a hormone.

93. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises a receptor.

94. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an enzyme inhibitor or enzyme cofactor.

95. The kit of claim 85 wherein said recognizing portion on said bridging entity comprises an enzyme active site or cofactor binding site.

96. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence on said bridging entity codes for a gene product or fragment thereof.

97. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence of said bridging entity does not code for a gene product or fragment thereof.

98. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence of said bridging entity comprises a poly dG, poly dC, poly dT, poly dA sequence, or a low complexity (repeating) polynucleotide.

99. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence on said



bridging entity comprises a sequence portion which is rich in guanosine residues.

100. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to another polynucleotide sequence.
101. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an antibody.
102. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an antigen.
103. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a saccharide.
104. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a lectin.
105. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a hormon.
106. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to a receptor.
107. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an enzyme inhibitor or enzyme cofactor.
108. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide sequence in said bridging entity is covalently attached to an enzyme.
109. The kit of claim 85 wherein said bridging entity is a circular DNA polymer.
110. The kit of claim 109 wherein said circular DNA polymer is single-stranded.
111. The kit of claim 110 wherein said circular DNA polymer is derived from a filamentous phage.
112. The kit of claim 109 wherein said filamentous phage is M13 or a variant thereof.
113. The kit of claim 110 wherein said M13 phage carries a sequence portion which is rich in guanosine or cytosine residues.

114. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide portion on signalling entity codes for a gene product or fragment thereof.
115. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity does not code for a gene product or fragment thereof.
116. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity comprises a poly dC, poly dG, poly dA, poly dT sequence, or a low complexity (repeating) polynucleotide.
117. The kit of claim 85 wherein said polynucleotide portion on said signalling entity comprises a sequence portion which is rich in cytosine or guanosine residues.
118. The kit of claim 85 wherein said signalling entity is a circular DNA polymer.
119. The kit of claim 118 wherein said DNA is single-stranded.
120. The kit of claim 118 wherein said DNA is derived from a filamentous phage.
121. The kit of claim 118 wherein said phage is M13 or a variant thereof.
122. The kit of claim 85 wherein said signal generating portion on said signalling entity is radiolabeled.
123. The kit of claim 85 wherein said signal generating portion of said signalling entity is not radiolabeled.
124. The kit of claim 123 wherein said signal generating portion comprises an enzyme.
125. The kit of claim 123 wherein said signal generating portion comprises a biotin moiety.
126. The kit of claim 123 wherein said signal generating portion comprises a fluorogen.
127. The kit of claim 123 wherein said signal generating portion comprises an electron dense compound.
128. The kit of claim 127 wherein said signal generating portion comprises or binds to an insoluble phase.

129. The kit of claim 123 wherein said insoluble phase comprises a latex particle, a resin, or a bacterium.
130. The kit of claim 123 wherein said signal generating portion comprises an antibody.
131. The kit of claim 123 wherein said signal generating portion comprises a saccharide.
132. The kit of claim 85 wherein said recognizable portion on said analyte is a polynucleotide sequence, said recognizing portion on said bridging entity is a polynucleotide sequence capable of stably annealing thereto, said bridging entity is a single-stranded DNA polymer, and said signal generating portion on said signalling entity is based on non-radioactive detection.
133. The kit of claim 132 wherein said bridging entity is derived from a filamentous phage.
134. The kit of claim 132 wherein said signalling entity is derived from a filamentous phage.
135. A composition comprising:
- a molecular bridging entity (B) having thereon:
    - (i) first portion capable of recognizing and binding to said molecularly recognizable portion on said analyte (A); and
    - (ii) one or more second portions, each such portion comprising one or more polynucleotide sequences;
  - and
  - one or more signalling entities (C), each such entity having thereon:
    - (i) a polynucleotide portion capable of annealing to said polynucleotide second portion of said bridging entity (B), thereby to form a stable polynucleotide hybrid; and
    - (ii) one or more signal generating portions.
136. The composition of claim 135 wherein said molecular bridging entity (B) comprises more than two second portion.
137. The composition of claim 136 wherein the number of the ratio of polynucleotide second portions to the recognizing first portion is greater than two.
138. The composition of claim 137 wherein the number ratio is greater than 5.
139. The composition of claim 138 wherein the number ratio is greater than

- 10.
140. The composition of claim 135 wherein the number of the ratio of signalling entities (C) to the molecular bridging entity (B) is greater than two.
141. The composition of claim 140 wherein the number ratio is greater than 5.
142. The composition of claim 141 wherein the number ratio is greater than 10.
143. The composition of claim 135 wherein the ratio of the number of the signal generating portions to the polynucleotide portion in the signalling entity or entities (C) is greater than two.
144. The composition of claim 143 wherein the ratio number is greater than 5.
145. The composition of claim 144 wherein the ratio number is greater than 10.
146. The composition of claim 135 wherein said molecular bridging entity (B) comprises more than two second portions, and/or said two part composition comprises more than two signalling entities (C), and/or more than two signal generating portions.
147. The composition of claim 146, wherein the number of the ratio of the second portions to the first portion in the molecular bridging entity (B) is greater than two, and/or the number of the ratio of the signalling entities (C) to the molecular bridging entity (B) is greater than two, and/or the number of the ratio of signal generating portions to the polynucleotide portions in the signalling entities (C) is greater than two.
148. The composition of claim 147 wherein each of the number ratios are independently greater than 5.
149. The composition of claim 148 wherein each of the number ratios are independently greater than 10.